

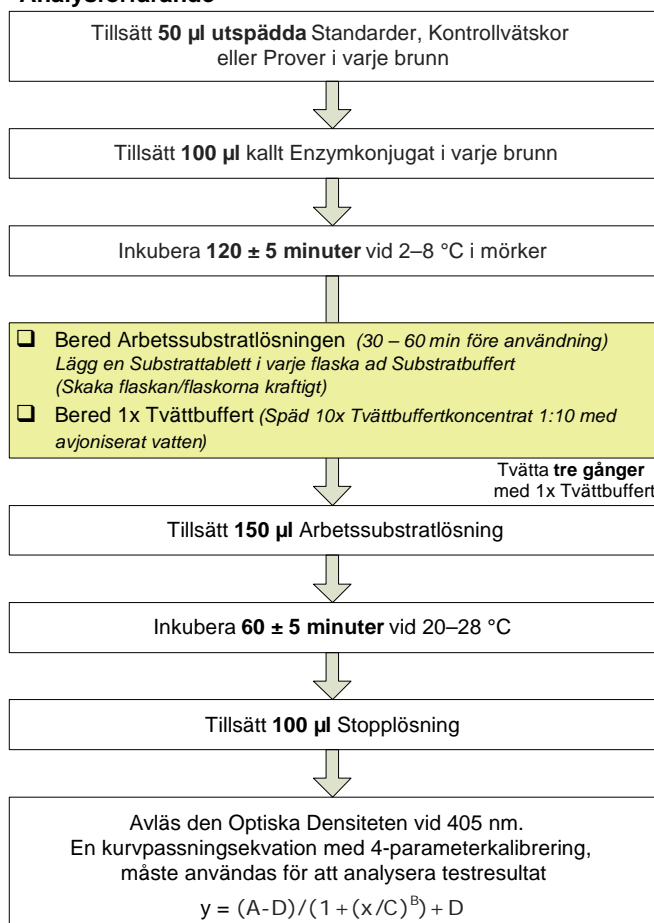
Enzymimmunoanalys för kvantitering av tvärbindingar av deoxypyridinolin (DPD) i mänsklig urin

MicroVue™ DPD EIA Summariskt

Reagent och Prov Förberedelse

- Bered Enzymkonjugat med Analysbuffert; förvara vid 2–8 °C. (7 ml kallt Analysbuffert för varje flaskor med Enzymkonjugat.)
- Späd Prover, Standarder och Kontrollvätskor 1:10 med Analysbuffert (till exempel, 50 µl Prov och 450 µl Analysbuffert)

Analysförfarande



iu AVSETT ANVÄNDNINGSSOMRÅDE

MicroVue DPD är en urinalys som ger ett kvantitativt mått på utsöndring av tvärbindingar av deoxypyridinolin (DPD) som en indikator på benresorption. Förhöjda nivåer av DPD i urinen indikerar förhöjd benresorption hos patienten. Mätningen av DPD är avsedd för övervakning av förändringar i benresorption hos postmenopausala kvinnor som behandlas antiresorptivt med hormoner eller bisfosfonat och hos patienter med diagnosen osteoporos.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Ungefär 90 % av den organiska vävnaden i ben är typ I-kollagen, ett trippelhelixprotein.¹ Typ I-kollagen av ben är tvärbundet av specifika molekyler som ger stelhet och styrka. Tvärbindingar av moget typ I-kollagen i ben är pyridintvärbindingar, pyridinolin (PYD) och deoxypyridinolin (DPD).^{1,2} DPD formas av lisyloxidasets enzymatiska verkan på aminosyran lysin.³ DPD frigörs i cirkulationen under benresorptionen.²⁻⁵ DPD utsöndras ometaboliserat i urinen och påverkas inte av kosten,⁶ vilket gör det lämpligt för bedömning av resorption.

Ben genomgår konstant en metabolisk process som kallas benremodellering.^{2,7} Den omfattar en nedbrytande process, benresorption, som utförs av osteoklaster, och en uppbyggande process, benformation, som utförs av osteoblaster.^{2,7} Benremodelleringen är nödvändig för skelettets fortlevnad och kondition, och är nära sammankopplad – dvs. benresorptionen och benformationen är i balans.⁷ I abnorma fall av benmetabolism bryts balansen, och om resorptionen är större än formationen leder det till benförlust.⁷ Mätning av specifika nedbrytningsprodukter från benvävnad ger analytiska data angående benmetabolismens balans.^{2,4,5}

Osteoporos är en metabolisk bensjukdom som karakteriseras av abnorm benremodellering. Det är en systemisk skelettsjukdom som karakteriseras av låg benmassa och mikrostrukturell försvagning i benvävnaden, med ökad känslighet för benfrakturer som följd.⁸ Den vanligaste typen av osteoporos drabbar postmenopausala kvinnor som resultat av östrogenbrist när äggstockarnas funktion upphör.⁷ Hormonbehandling som återställer östrogen-nivåerna förhindrar benförlust och osteoporos.⁷⁻¹⁰ Östrogener och en klass föreningar som kallas bisfosfonater är antiresorptiva behandlingar som kan användas för att förhindra benförlust eller för att behandla osteoporos.⁷⁻¹² Osteoporos kan också orsakas av otillräcklig högsta benmassa under tillväxtåren, en åldersrelaterad obalans i benremodelleringen med nettoöverskott av resorption och ett antal kliniska tillstånd och behandlingar som leder till benförlust eller obalans i benremodelleringen.⁷ De omfattar endokrina sjukdomar som hypogonadism, hypertyreoidism, hyperparatyreoidism och hyperkortisolism; gastrointestinala sjukdomar som är relaterade till näring och mineralmetabolism; besläktade vävnadssjukdomar; multipelt myelom; kronisk förlamning; alkoholism eller tobaksbruk; och kronisk behandling med heparin eller kortikosteroider.⁷ Andra sjukdomar som karakteriseras av abnorm benremodellering är bland annat Pagets sjukdom och metastatisk bencancer.³

För MicroVue DPD-analysen användes antikroppsteknik för att ge en monoklonal antikropp som visar specificiteten för DPD.¹³ Specificiteten för den monoklonala antikroppen som används i MicroVue DPD-analysen möjliggör enkel, praktisk, reproducerbar och direkt kvantifiering av DPD i urin.

PROCEDURENS PRINCIP

MicroVue DPD-analysen är en kompetitiv enzymimmunoanalys i mikrotiter stripwell-format med en monoklonal anti-DPD-antikropp på remsan för att fånga DPD i provet. DPD i provet konkurrerar med konjugerat DPD-alkalin-fosfatas om antikroppen och reaktionen detekteras med ett pNPP-substrat. MicroVue DPD-resultat korrigeras för urinkoncentration av kreatinin.

MEDFÖLJANDE REAGENSER OCH MATERIAL

96 analyser för tvärbindingar av deoxypyridinolin

MicroVue DPD EIA-sats innehåller följande:

A

B DPD-standard A till F **Komponent 4203 till 4208** **0,3 ml/st**

C (A = 0, B = 3, C = 10, D = 30, E = 100, F = 300 nmol/l DPD)

D DPD renat ur ben av nöt i 10 mmol/l fosforsyra med natriumazid
E (0,05 %) som konserveringsmedel

F

L Låga/Höga kontroller **Komponent 4209, 4210** **0,3 ml/st**

H DPD renat ur ben av nöt i 10 mmol/l fosforsyra med natriumazid
(0,05 %) som konserveringsmedel

1 **Remsor med beläggning** **Komponent 4661** **12 st**
Renad mus-monoklonal Anti-DPD-antikropp på Stripwell-remsor

2 **Stopplösning** **Komponent 4702** **15 ml**
0,5N NaOH

3 **10x tvättbuffert** **Komponent 4703** **55 ml**
Nonjonaktivt rengöringsmedel i buffertlösning med natriumazid
(0,05 %) som konserveringsmedel

4 **Analysbuffert** **Komponent 4704** **55 ml**
Nonjonaktivt rengöringsmedel i buffertlösning med natriumazid
(0,05 %) som konserveringsmedel

5 **Substratbuffert** **Komponent 4705** **3 x 10 ml**
Lösning av dietanolamin och magnesiumklorid med natriumazid
(0,05 %) som konserveringsmedel

6 **Substrattabletter** **Komponent 0012** **3 x 20 mg**
p-nitrofenylfosfat

7 **Enzymkonjugat** **Komponent 4202** **3 st**
Lyofiliserat DPD, renat från ben av nöt, konjugerat till alkaliskt
fosfatas innehållande buffertsalter och stabiliseringsmedel

Tejplock för platta **Komponent 0047** **3 st**

NÖDVÄNDIGT MATERIAL SOM INTE MEDFÖLJER

- Mikropipetter för 50 till 300 µl
- Lämpliga mätkärl för 7 till 300 ml
- Behållare för tvättbuffertspädning
- Provrör för spädning av prover, standarder och kontrollvätskor
- Avjoniserat eller destillerat vatten
- Plattläsare för avläsning vid 405 nm
- Programvara för kurvpassning med 4-parameterskalibrering
- Kreatininvärden (mmol/l) för urinprover

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. För *in vitro*-diagnostik.
2. Behandla alla prover som biologiskt riskmaterial. Hantera satsens innehåll och patientprover med försiktighet.
3. Behållare och oanvänt innehåll ska kasseras i enlighet med gällande lagar och bestämmelser.
4. Medföljande reagenser används som en enhet fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen.
5. Hantera satsens innehåll bär lämpliga skyddskläder, handskar och ögon/ansiktsskydd.
6. Förvara analysreagenser enligt anvisningen.
7. Använd inte remsor med beläggning om det finns hål på förpackningen.
8. Dubbeltesta varje prov.
9. 0,5N NaOH är frätande och kan orsaka svåra brännskador. Får inte förtäras. Undvik kontakt med hud, ögon eller kläder. Tvätta bort spilld 0,5N NaOH med vatten. Kontakta läkare vid förtäring.
10. Natriumazid används som konserveringsmedel. Tillfällig kontakt med eller förtäring av buffertlösningar med natriumazid kan orsaka irritation på hud, ögon och i munnen. Använd bara buffertlösningarna för de avsedda ändamålen och undvik kontakt med syror. Natriumazid kan reagera med bly- och kopparrör och bilda högexplosiva metallazider. Spola med stora mängder vatten när azider kasseras för att undvika azidansamling.
11. Substratbufferten innehåller dietanolamin och kan irritera ögon och/eller hud vid längre kontakt. Bär lämpliga skyddskläder, handskar och ögon/ansiktsskydd. Kontaktade områden skall omedelbart tvättas med tvål och vatten.
12. Standarder och kontrollvätskor är i fosforsyra, 10 mmol/l. Undvik kontakt med hud, ögon eller kläder. Får inte förtäras. Tvätta bort spilld 0,5N NaOH med vatten. Kontakta läkare vid förtäring.
13. Multikanal- eller repeterpipetter bör användas vid uppmätning av reagenser.
14. För korrekt provmätning ska exakta mängder prover och standarder tillsättas. Pipettera omsorgsfullt med kalibrerad utrustning.
15. Späd prover som är större än 300 nmol/l i analysbufferten och testa om. Ta med spädningsfaktorn i slutberäkningen.
16. Analysen utförs med vilken som helst validerad tvättmetod.
17. Deoxypyridinolinstandarder, kontrollvätskor och enzymkonjugat är ljuskänsliga. Undvik långvarig exponering för ljus, särskilt direkt eller indirekt solljus. Förvara reagenserna mörkt när de inte används. Prover och reagenser påverkas inte märkbart av vanlig elektrisk laboratoriebelysning när de hanteras enligt beskrivningen i Analysprocedur.
18. Om rumstemperaturen inte kan hållas mellan 20 och 28 °C, och absorbanter under 2,0 inte är kompatibla med plattläsaren, ska substratets utveckling i standard A-brunnarna övervakas; när den optiska densiteten når 1,2–1,5 ska reaktionen stoppas och remsorna avläsas.

REAGENSFÖRBEREDELSE

Tvättbuffert – se anmärkning om procedur i avsnittet ANALYSPROCEDUR

Bered den rätta mängden 1x tvättbuffert (se tabell i ANALYSPROCEDUR) genom att späda 10x tvättbuffert-koncentrat 1:10 med avjoniserat vatten. Förvara vid 20-28 °C. Använd 1x tvättbufferten inom 21 dagar från beredningen.

Särskilda tvättinstruktioner: Bered 1x tvättlösning enligt ovan och förvara vid 2–8 °C tills den ska användas.

Enzymkonjugat

Bered enzymkonjugat högst två timmar innan det ska användas. Rekonstituera alla flaskor med enzymkonjugat (se tabellen) med 7 ml analysbuffert. Förvara rekonstituerat enzymkonjugat vid 2–8 °C tills det ska användas

Arbetssubstratlösning

Substratbufferten måste vara mellan 20 och 28 °C innan analysen påbörjas (två timmar eller över natten rekommenderas). Bered arbetssubstratlösningen högst en timme innan den ska användas. Lägg en substrat-tablett i varje flaska substratbuffert vid 20–28 °C (se tabellen). Låt tablettens lösas upp i 30 till 60 minuter. Skaka flaskan/ flaskorna kraftigt så att lösningen blandas helt

FÖRVARING

Förvara satsen vid 2–8 °C.

Får inte frysas.

Förvara oanvänd reagens vid 2–8 °C.

PROVTAGNING OCH PROVFÖRVARING

MicroVue DPD-analysen kan utföras med urinprov utan preventivmedel från första eller andra morgonurinen. Provtagningen bör ske före 10,00 för att eliminera eventuell påverkan från dygnsvariation. Håll urinprovet kylt (2–8 °C) vid lagring i högst sju dagar, eller frys provet vid -20 °C eller kallare för längre förvaring. Provet får inte frysas och tinas mer än fem gånger. Undvik långvarig exponering för ljus, särskilt solljus. Under rutinbehandling påverkas inte proverna av vanlig elektrisk laboratoriebelysning.

Vid behandlingsövervakning ska baslinjeprover tas innan behandlingen börjar. För de följande jämförelserna ska proverna tas vid samma tid på dagen som baslinjeprovet.

ANALYSPROCEDUR

Läs hela produktbladet innan analysen påbörjas.

Läs avsnittet REAGENSBEREDNING före analysen.

PROCEDURNOT: MicroVue DPD-analysen är känslig för tvättningsförhållanden. **Hela tvättningen ska slutföras inom två minuter. Om tvättningen INTE kan slutföras inom två minuter ska Särskilda tvättinstruktioner i avsnittet REAGENSBEREDNING och Tvättning följas.**

Avgör hur mycket av varje reagens som behövs utifrån antalet remsor som ska användas.

Antal remsor	4	6	8	12
Antal prover (parprover)	8	16	24	40
Enzymkonjugat (flaska)	1	1	2*	2*
Substrat (flaska)	1	1	2*	2*
1x tvättbuffert (ml)	100	150	200	300

*Om mer än en flaska används ska innehållet blandas före användning.

Inkubering av prov/enzymkonjugat

1. Späd prover, standarder och kontrollvätskor 1:10 med analysbuffert (till exempel 50 µl prov och 450 µl analysbuffert).
2. Ta ut Stripwell-ramen och det antal remsor med beläggning som behövs från förpackningen (se tabellen). Förpackningar med oanvända remsor måste återförslutas helt.
3. Placera önskat antal remsor med beläggning i Stripwell-ramen. Märk remsorna för att undvika att de blandas ihop om de tas bort från ramen av misstag.
4. Tillsätt 50 µl standard, kontrollvätska eller prov i varje brunn på remsorna med beläggning. Detta steg ska slutföras inom 30 minuter.
5. Bered enzymkonjugat högst två timmar innan det ska användas. Rekonstituera alla flaskor med enzymkonjugat (se tabellen) med 7 ml analysbuffert. Förvara rekonstituerat enzymkonjugat vid 2–8 °C tills det ska användas.
6. Tillsätt 100 µl rekonstituerat enzymkonjugat i varje brunn. Täck remsorna med den medföljande tejen. Inkubera två timmar ± fem minuter vid 2–8 °C. Inkuberingen ska utföras i mörker.
7. Bered arbetssubstratlösningen högst en timme innan den ska användas. Lägg en substrat-tablett i varje flaska 20–28 °C ad substratbuffert (se tabellen). Låt tablettens lösas upp i 30 till 60 minuter. Skaka flaskan/flaskorna kraftigt så att lösningen blandas helt.

Tvättning

8. Bered erforderad mängd 1x tvättbuffert (se tabell) genom att späda 10x tvättbuffert 1:10 med avjoniserat vatten. Vänd/töm remsorna för hand. Tillsätt minst 250 µl 1x tvättbuffert i varje brunn och vänd/töm remsorna för hand. Upprepa ytterligare två gånger (totalt tre tvättningar). Torka av remsorna ordentligt på pappershanduk efter den sista tvättningen. Torka remsornas undersida med en luddfri pappershanduk medan de är vända så att även undersidan blir ren.
Särskilda tvättinstruktioner: Utför tvättningen enligt ovan med kall(2–8 °C) 1x tvättbuffert. Låt remsorna torka mellan fem och tio minuter efter den sista tvättningen innan substrat tillsätts.

Substratinkubering

9. Tillsätt 150 µl arbetssubstratlösning i varje brunn.
10. Inkubera 60 ± 5 minuter vid 20–28 °C.

Stopp/avläs

11. Tillsätt 100 µl stopplösning i varje brunn. Tillsätt stopplösningen i samma mönster och med samma tidsintervall som substratlösningen tillsattes.

12. Avläs den optiska densiteten vid 405 nm. Kontrollera att det inte finns några stora bubblor i brunnarna och att remsornas undersidor är rena. Remsorna ska avläsas inom **15 minuter** från att stopplösningen tillsatts.
13. Kvantitativ programvara, som använder en kurvpasningsekvation med 4-parameterkalibrering, måste användas för att analysera testresultat från MicroVue DPD.
Ekvation: $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$
14. Avgör koncentrationen i prover och kontrollvätskor från standardkurvan.
15. Kontrollvärdena ska ligga inom det område som anges i det medföljande analyscertifikatet.

KVALITETSKONTROLL

Analyscertifikatet som medföljer produkten är partispecifikt och ska användas för att intyga att laboratoriets resultat liknar dem som erhålles på Quidel Corporation. De optiska densitetsvärdena är givna och ska endast användas som riktlinjer. Resultatet i ert laboratorium kan avvika.

Kvalitetskontrollområden medföljer. Kontrollvärdena är avsedda att bekräfta kurvans och testresultatets giltighet. Varje laboratorium ska upprätta egna parametrar för vad som är acceptabla analysvärden. Om kontrollvärdena INTE ligger inom laboratoriets acceptansgränser, ska analysresultaten ifrågasättas och proverna ska upprepas. Om den optiska densiteten för MicroVue DPD standard A är mindre än 0,8, ska resultatet ifrågasättas och proverna bör upprepas.

RESULTATTOLKNING

Resultaten från MicroVue DPD-analysen måste korrigeras för variationer i urinens koncentration genom att DPD-värdet (nmol/l) delas med kreatininvärdet (mmol/l) i varje prov (kreatinin mg/dl x 0,088 = mmol/l). De slutliga resultaten av MicroVue DPD uttrycks i nmol DPD/mmol kreatinin.

Representativ standardkurva

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



PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

Medan MicroVue DPD används som indikation på benresorption, har det här testet inte fastställts förutsäga utveckling av osteoporos eller framtida risk för fraktur. Användning av det här testet har inte etablerats för hyperparatyreoidism eller hypertyreoidism. När MicroVue DPD används för att övervaka behandling, kan resultatet påverkas om patienten har ett kliniskt tillstånd som påverkar benresorptionen, till exempel benmetastaser, förutom de sjukdomar som anges ovan. MicroVue DPD-resultat ska tolkas i kombination med kliniska observationer och andra diagnosresultat, inte som ensamt avgörande för inledning eller ändring av behandling.

PROV VÄRDEN

Referensområden för MicroVue DPD har fastställts för friska män (n = 121) och friska premenopausala kvinnor (n = 312) över 25 års ålder. För etableringen av referensområden definierades följande friska subjekt:

- friska, utan bensjukdomar eller endokrina eller kroniska sjukdomar
- med regelbunden menstruationscykel (kvinnor)
- ej gravida eller ammande (kvinnor)
- ingen medicinering med känd inverkan på benmetabolismen (till exempel medicinering med kortikosteroider, GnRH-analoger, antikonvulsanter, heparin, sköldkörtelmedicin).

Värdena kan påverkas av faktorer som låg östrogenproduktion, lågt kalciumintag, låg fysisk aktivitet eller sjukdomar med känd inverkan på benmetabolismen, såsom osteoporos, Pagets sjukdom, hyperparatyreoidism, hypertyreoidism och benmetastas. Östrogenbrist hos postmenopausala kvinnor kan leda till förhöjd benresorption. Det premenopausala referensområdet bör användas för att tolka resultaten hos postmenopausala kvinnor. Varje laboratorium bör fastställa egna referensområden. Områdena uttrycks som icke-parametriska referensintervaller (90 % CI).

	Ålder (år)	Medelvärde (nmol DPD/mmol Kr)	SD	Område
Kvinnor	25 - 44	5,0	1,4	3,0 - 7,4
Män	25 - 55	3,8	1,0	2,3 - 5,4

Förväntad variation för enskilda testpersoner avgjordes med urinprover från 49 friska personer. Proverna togs fem ej på varandra följande dagar under två veckor. Genomsnittet för individuell longitudinell variation var 15,5 %. Variationen mellan testpersoner reflekteras i de icke-parametriska referensintervallen ovan.

PRESTANDASPECIFIKATIONER

Antikroppspezifitet

Den monoklonala anti-DPD-antikroppen har selektiv, hög affinitet för fritt DPD och försumbar bindning till DPD-peptider och fritt eller peptidbundet pyridinolin (PYD).

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

Känslighet

MicroVue DPD-analysens minsta avkänningsgräns är 1,1 nmol/l, vilket avgörs av den övre 3-SD-gränsen i en studie med nollstandard.

Återhämtning – pik-återhämtning

Pik-återhämtning avgjordes genom att en känd mängd renat DPD tillsattes i urinprover med olika nivåer endogent DPD. Typiska resultat visas nedan.

Prov	Endogent (nmol/l)	Tillsatt (nmol/l)	Observerat (nmol/l)	Återhämtning (%)
1	3,1	27,3	32,0	106
2	11,2	27,3	38,8	101
3	18,2	27,3	44,9	98

Återhämtning – linjäritet

Linjäriteten avgjordes genom att prover späddes seriellt. De observerade värdena jämfördes med förväntade värden. Typiska resultat visas nedan.

Prov	Spädningsfaktor	Observerat (nmol/l)	Förväntat (nmol/l)	Återhämtning (%)
1	konc.	65,5	-	-
	1:2	31,8	32,8	97
	1:4	15,4	16,4	94
2	konc.	84,6	-	-
	1:2	39,3	42,3	93
	1:4	19,4	21,1	92
3	konc.	132,6	-	-
	1:2	65,6	66,3	99
	1:4	30,2	33,2	91
	1:8	16,8	16,6	101

Precision

Precision inom tester bestämdes för ≥ 21 replikat av 3 prov på 2 plattor från var och en av 3 partier (totalt 6 plattor). Precision mellan tester bestämdes för 3 prov, som körts i 9 separata plattor från var och en av 3 partier (totalt 27 plattor). Proverna som visas nedan representerar ett område nmol/l-värden. För en kvinna med kreatinin på 4,5 mmol/l, representerar prov 1 till 3 låg normal, hög normal och förhöjd resorption (2,4 nmol/mmol, 6,7 nmol/mmol respektive 38,8 nmol/mmol).

Prov	DPD (nmol/l DPD)	CV % Inom test ¹	CV % mellan tester ²
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 = nio tester

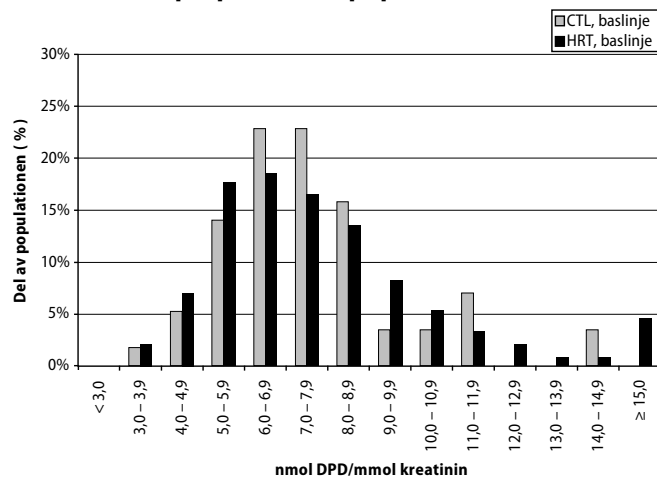
KLINISKA STUDIER

Användning av MicroVue DPD för övervakning av anti-resorptiv hormonbehandling av postmenopausala kvinnor

Ett slumpmässigt kontrollerat multicenterförsök utfördes framgångsrikt för att fastställa MicroVue -DPD-analysens säkerhet och effektivitet för övervakning av förändringar i DPD-utsöndring i urinen i samband med anti-resorptiv behandling med östrogen/progestin. Ökad benresorption och betydande benförlust hör ofta ihop med postmenopausal östrogenbrist. Östrogensättning har visats minska resorptionen effektivt och skydda befintlig benmassa.⁷⁻¹⁰ Testpersonerna var postmenopausala kvinnor från 45 till 64 års ålder (medel 56 ± 4 år) som genomgått naturlig eller kirurgisk menopause de senaste tio åren. Vid baslinjen placerades lämpliga testpersoner slumpmässigt i en aktiv behandlingsgrupp (HRT): Premarin® (0,625 mg per dag) med placeboprogestin, Premarin (0,625 mg per dag) och ett aktivt progestin (Provera® 2,5 mg per dag kontinuerligt, Provera 10 mg per dag cyklistiskt eller mikroniserat progesteron 200 mg per dag cyklistiskt); eller i kontrollgruppen (CTL): placeboöstrogen och placeboprogestin. Prover togs från första eller andra morgonurinen vid baslinjen och efter tolv månader från alla testpersoner. MicroVue DPD-resultat korrigerades för kreatinintömning och uttrycktes i nmol DPD/mmol kreatinin.

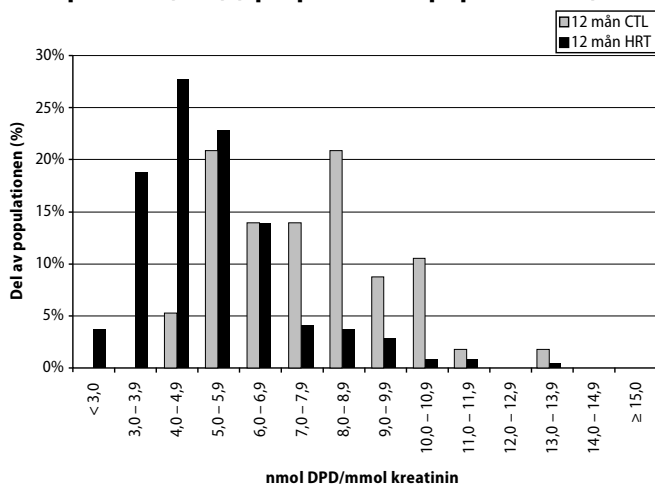
Medelvärdet (± 1 SD) för DPD-koncentrationen vid baslinjen ($7,56 \pm 2,27$ jämfört med $7,94 \pm 3,25$ nmol/mmol, $p = 0,304$) och BMD i ländryggraden ($0,97 \pm 0,17$ jämfört med $0,97 \pm 0,15$ g/cm², $p = 0,792$) hade liknande värden för CTL och HRT. Fördelningen av baslinjevärden för DPD i HRT och CTL visas i Figur 1 i proportion till studiepopulationen.

Figur 1. Fördelning av DPD-nivåer vid baslinjen (i proportion till populationen)



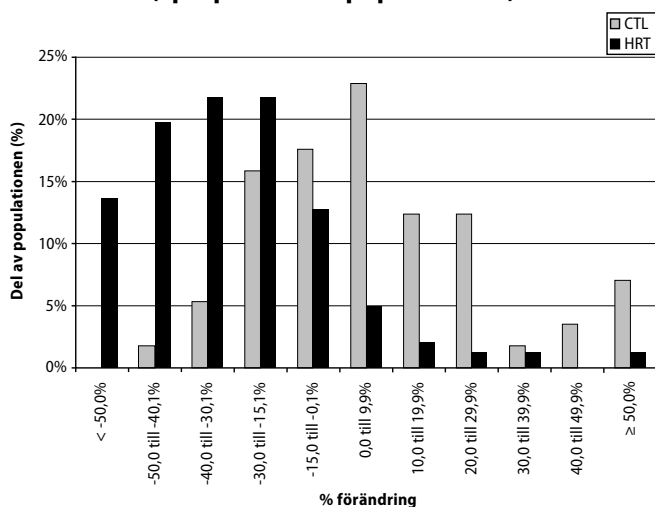
DPD var avsevärt lägre för HRT än CTL vid tolv månader ($5,27 \pm 1,78$ jämfört med $8,08 \pm 3,63$ nmol/mmol, $p < 0,00001$). Vid tolv månader var testpersoner i HRT-gruppen mer benägna än dem i CTL-gruppen att ha en DPD-koncentration som var $\leq 7,4$ nmol/mmol (89 % jämfört med 51 %, $p < 0,00001$) även om baslinjeproporTIONerna var liknande för de två grupperna (CTL 56 %, HRT 53 %, $\leq 7,4$ nmol/mmol). Fördelningen av DPD-värden efter tolv månader i HRT- och CTL-grupperna visas i Figur 2.

Figur 2. Fördelning av DPD-nivåer efter tolv månaders behandling med östrogen/progestin (HRT) eller placebo (CTL) (i proportion till populationen)



Medelvärdet (± 1 SD) för DPD-koncentrationen hos CTL-testpersonerna ökade något från baslinjen till $+11,7\%$ ($\pm 49,7\%$) vid tolv månader ($p = 0,278$) medan DPD-koncentrationen hos HRT-testpersoner minskade från baslinjen till $-29,1 \pm 23,8\%$ vid tolv månader ($p < 0,0001$). Fördelningen av den procentuella förändringen av DPD-värden från baslinjen till tolv månader i HRT- och CTL-grupperna visas i Figur 3.

Figur 3. Fördelning av procentuell förändring av DPD-nivåer efter tolv månaders behandling med östrogen/progestin (HRT) eller placebo (CTL) (i proportion till populationen)



Vid tolv månader hade testpersoner i HRT-gruppen förhöjd BMD i ländryggraden jämfört med CTL-gruppen ($p < 0,00001$), vilket visas i tabell 1.

Tabell 1. Förändring i LSBMD (medel \pm SD)

	n	Baslinje (g/cm ²)	Tolv månader (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

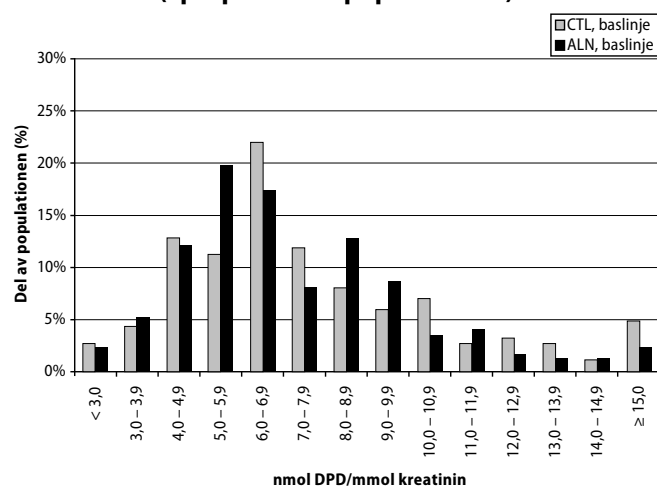
Resultaten visar att MicroVue -DPD-analysen är ett säkert och effektivt sätt att övervaka den anti-resorptiva effekten av behandling med hormonerättning hos postmenopausala kvinnor.

Användning av MicroVue DPD för övervakning av anti-resorptiv bisfosfonatbehandling av osteoporos

Ett slumpmässigt kontrollerat multicenterförsök utfördes framgångsrikt för att fastställa MicroVue -DPD-analysens säkerhet och effektivitet att övervaka förändringar i DPD-utsöndring i urinen i samband med anti-resorptiv behandling med aminobisfosfonat (alendronat). Testpersonerna var postmenopausala kvinnor mellan 45 och 84 års ålder (medel 64 ± 7 år) med diagnosen osteoporos (utifrån en klinisk presentation eller om baslinjen för ländryggradens mineraltäthet [BMD] var mer än 2,5 standardavvikelse under medelvärdet för mogna premenopausala kvinnor). Vid baslinjen fick lämpliga testpersoner slumpmässigt antingen 10 mg alendronat och 500 mg kalcium per dag (ALN) eller 500 mg kalcium per dag (CTL). Prover togs ur andra morgonurinen vid baslinjen och efter tre, sex och tolv månader från alla testpersoner. MicroVue DPD-resultat korrigerades för kreatinin-clearance och uttrycktes i nmol DPD/mmol kreatinin.

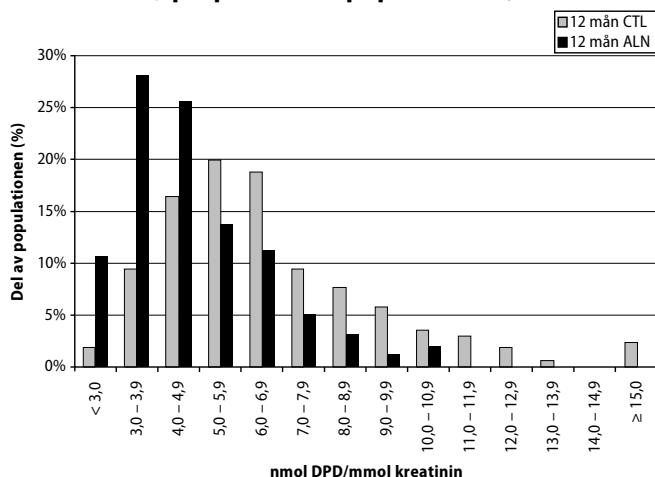
Medelvärdet (± 1 SD) för DPD-koncentrationen vid baslinjen ($7,35 \pm 3,30$ jämfört med $7,74 \pm 3,47$ nmol/mmol, $p = 0,278$) och BMD i ländryggraden ($0,75 \pm 0,09$ jämfört med $0,74 \pm 0,10$ g/cm², $p = 0,426$) hade liknande värden för ALN och CTL. Fördelningen av baslinjevärden för DPD i ALN och CTL visas i Figur 4 i proportion till studiepopulationen.

Figur 4. Fördelning av DPD-nivåer vid baslinjen (i proportion till populationen)



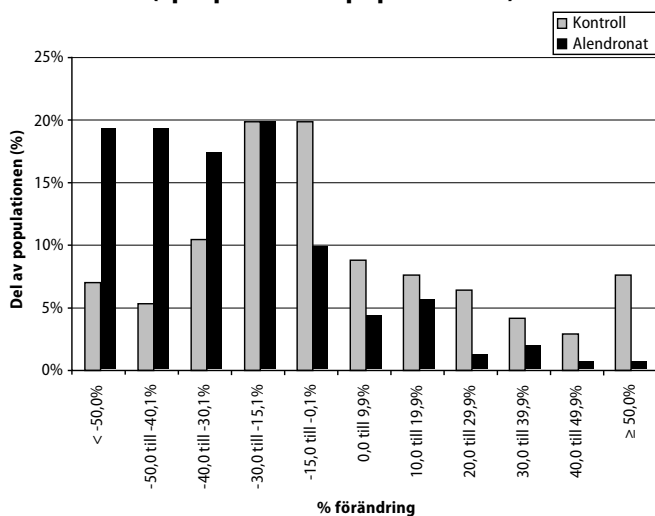
DPD var avsevärt lägre för ALN än CTL vid tre ($5,45 \pm 2,61$ jämfört med $7,56 \pm 3,08$, $p < 0,00001$), sex ($4,83 \pm 1,94$ jämfört med $7,09 \pm 3,33$ nmol/mmol, $p < 0,00001$) och tolv månader ($4,78 \pm 1,75$ jämfört med $6,73 \pm 2,98$ nmol/mmol, $p < 0,00001$). Vid tre, sex och tolv månader hade 84, 89 respektive 91 % av ALN-testpersonerna en DPD-koncentration som var $\leq 7,4$ nmol/mmol. Testpersoner i ALN-gruppen var mer benägna än dem i CTL-gruppen att ha en DPD-koncentration som var $\leq 7,4$ nmol/mmol vid alla tidpunkter ($p = 0,002$) även om baslinjeproportionerna var liknande för de två grupperna (CTL 60,4 % respektive ALN 57,8 % $\leq 7,4$ nmol/mmol). Fördelningen av DPD-värden efter tolv månader i ALN- och CTL-grupperna visas i Figur 5.

Figur 5. Fördelning av DPD-nivåer efter tolv månaders behandling med alendronat (ALN) eller kalcium (CTL) (i proportion till populationen)



Medelvärde (± 1 SD) för DPD-koncentration hos CTL-testpersonerna minskade gradvis från baslinjen till $-4,9\%$ ($\pm 34,9\%$) vid tolv månader ($p = 0,003$), vilket kan bero på kalciumets begränsade bensparande effekt.¹⁵ Medelvärde för DPD-koncentration hos ALN-testpersoner minskade med $22,9 \pm 37,4\%$ vid tre månader, $28,6 \pm 25,8\%$ vid sex månader och $29,5 \pm 26,7\%$ vid tolv månader. Fördelningen av den procentuella förändringen av DPD-värden från baslinjen till tolv månader i ALN- och CTL-grupperna visas i Figur 6.

Figur 6. Fördelning av procentuell förändring i DPD-nivåer efter tolv månaders behandling med alendronat (ALN) eller kalcium (CTL) (i proportion till populationen)



Vid tolv månader hade testpersoner i ALN-gruppen förhöjd BMD i ländryggraden jämfört med CTL-gruppen ($p < 0,00001$), vilket visas i tabell 2.

Tabell 2. Förändring i LSBMD (medel \pm SD)

	n	Baslinje (g/cm ²)	Tolv månader (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

Resultaten visar att MicroVue -DPD-analysen är ett säkert och effektivt sätt att övervaka den antiresorptiva effekten av behandling med aminobisfosfonat (alendronat) för testpersoner med diagnosen osteoporos.

Ytterligare studier

Kliniska studier utfördes för att utvärdera deoxyypyridinolvärdena i urin med MicroVue DPD-analys jämfört med HPLC-analys¹⁴ och klinisk analys.

Den första studien utfördes på kliniska undersökningsanläggningar med 54 prover från friska frivilliga och 140 prover från patienter med kända bensjukdomar (inklusive osteoporos, Pagets sjukdom, hyperparatyroidism och hypertyroidism). Sjukdomarna medför ofta förhöjd benresorption, därför ansågs testgruppen vara en riskpopulation. Alla testpersoner förväntades emellertid inte ha förhöjd benresorption vid provinsamlingen. 103 av de 140 patienterna med sjukdomsdiagnos hade inte förhöjda pyridinolvärden enligt HPLC-mätningen. Deoxyypyridinolvärdena från MicroVue DPD-analysen för friska testpersoner varierade mellan 2,3 till 11,2 nmol/mmol och för patienter mellan 1,2 och 37,2 nmol/mmol.

I studien jämfördes MicroVue DPD-analysen med en HPLC-forskningsmetod¹⁴ för mätning av pyridinolin. HPLC-tröskeln, som fastställdes i en studie som omfattade 84 friska testpersoner, befanns vara 50 nmol/mmol för män och 60 nmol/mmol för kvinnor (den övre gränsen konfidensintervall var 95 % för båda könen). Med förhöjt pyridinolin, fastställt genom HPLC som klassificeringsmetod, användes ROC-teknik (Receiver Operating Characteristic) för att definiera optimal relativ känslighet och specificitet i den beskrivna populationen. Relativ känslighet och specificitet presenteras i tabell 3. En kontingenstabell med antalet testpersoner i varje klass visas i Figur 7.

Tabell 3

MicroVue DPD	
Relativ känslighet	69 %
Specificitet	87 %

Figur 7

		HPLC Förhöjd	PYD Ej förhöjd
		+	-
MicroVue DPD	+	31	20
	-	14	129

I den andra studien jämfördes resultaten från MicroVue DPD-analysen i en blandad population av 39 prover från friska testpersoner och 69 prover från patienter med Pagets sjukdom. Även om Pagets sjukdom representerar en modell för identifiering av aktiv benresorption, var några av patienterna i studien under behandling, eller kan ha ansetts vara i remission och kanske inte hade förhöjd benresorption vid provtagningstillfället. I studien hade friska testpersoner från 2,3 till 6,4 nmol/mmol. Patienter med Pagets sjukdom hade från 1,7 till 50,4 nmol/mmol.

Med diagnosen för Pagets sjukdom som klassificeringsmetod, användes ROC-tekniken för att definiera optimal relativ känslighet och specificitet i den populationen. Relativ känslighet och specificitet visas i tabell 4. En kontingenstabell visas i Figur 8.

Tabell 4

MicroVue DPD	
Relativ känslighet	91 %
Specificitet	97 %

Figur 8

Diagnos Pagets

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

SUPPORT

Utanför USA: kontakta en lokal distributör för Quidel-produkter. Ytterligare information om Quidel, våra produkter eller distributörer finns på vår hemsida www.quidel.com.

Täcks av US Patent nr. 5,620,861, 5,700,694, 6,121,002, och 5,283,197.

REFERENSER

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.

ORDLISTA



Se handhavandebeskrivningen sur CDROM



Avsett användningsområde

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



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



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany