

Un essai immunoenzymatique servant à quantifier les liaisons croisées désoxypyridinoline (DPD) dans l'urine humaine

### MicroVue™ DPD EIA Sommaire

#### Préparation de réactif et d'échantillon

- Préparer le Conjugué Enzymatique avec Tampon Essai; le conserver à 2 à 8 °C. (7 mL de Tampon Essai froid par chaque flacon de Conjugé.)
- Diluer les Échantillons, solutions Étalon et solutions Témoin à 1/10 avec le Tampon Essai (par ex. 50 µl d'Échantillons + 450 µl Tampon Essai)

#### Procédure de l'essai

Ajouter **50 µL** de solution étalon, solution témoin ou échantillon **dilué** dans chaque puits des plaques enduites

Ajouter **100 µL** de conjugué enzymatique à chaque puits

Incuber pendant **120 ± 5 minutes** à 2–8 °C et dans l'obscurité

- Préparer la Solution de Substrat (30 – 60 min avant l'emploi) Placer un comprimé de substrat dans chaque flacon nécessaire de substrat tampon [Secouer le(s) flacon(s) énergiquement]
- Préparer le tampon de lavage 1X (Diluer 10X le concentré de lavage à 1/10 avec de l'eau dé-ionisé)

Laver à **3 reprises** avec Solution de Lavage

Ajouter **150 µL** de Solution de Substrat

Incuber pendant **60 ± 5 minutes** à 20 – 28 °C

Ajouter **100 µL** de Solution d'Arrêt

Lire la densité optique à 405 nm.  
Une équation d'ajustement des courbes à étalonnage quadratique doit être utilisée pour analyser les résultats  
 $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$

### APERÇU ET EXPLICATION

Environ 90 % de la matrice osseuse organique est composée de collagène de type I, une protéine à triple hélice.<sup>1</sup> Le collagène osseux est croisé avec des molécules spécifiques, qui lui fournissent rigidité et force. Les liaisons croisées de collagène osseux mûr de type I sont les liaisons croisées pyridinium, pyridinoline (PYD) et désoxypyridinoline (DPD).<sup>1,2</sup> La DPD est formée par l'action enzymatique de la lysyl oxydase sur l'acide aminé lysine.<sup>3</sup> La DPD est libérée dans la circulation pendant le processus de résorption osseuse.<sup>2-5</sup> La DPD est excrétée non métabolisée dans l'urine et n'est nullement affectée par le régime alimentaire,<sup>6</sup> ce qui la rend appropriée pour l'évaluation de la résorption.

L'os est perpétuellement sujet à un processus métabolique appelé remaniement.<sup>2,7</sup> Ce dernier comprend la résorption osseuse, induite par l'action des ostéoclastes, et un processus de formation, la formation osseuse, induite par l'action des ostéoblastes.<sup>2,7</sup> Le remaniement osseux est nécessaire au maintien et à la santé de l'os et il y est étroitement associé ; cela signifie que la résorption et la formation sont équilibrées.<sup>7</sup> Dans les cas de métabolisme osseux anormaux ce processus est dissocié et, quand la résorption est supérieure à la formation, ceci entraîne une déminéralisation osseuse nette.<sup>7</sup> La mesure de produits de dégradation spécifiques de la matrice osseuse fournit des données analytiques concernant le taux de métabolisme osseux.<sup>2,4,5</sup>

L'ostéoporose est une maladie métabolique des os qui se caractérise par un remaniement osseux anormal. C'est une maladie systémique du squelette caractérisée par une masse osseuse basse et une altération de la microarchitecture du tissu osseux, à l'origine d'une diminution de la résistance aux fractures.<sup>8</sup> Le type d'ostéoporose le plus fréquent est celui qui touche les femmes ménopausées suite à la carence en œstrogènes induite par la cessation de la fonction ovarienne.<sup>7</sup> Le rétablissement des taux d'œstrogènes précédant la ménopause par le traitement de substitution empêche la déminéralisation osseuse et l'ostéoporose.<sup>7-10</sup> Les œstrogènes et une classe de composés connus sous le nom de bisphosphonates sont des traitements inhibiteurs de la résorption osseuse, qui peuvent être utilisés pour prévenir la déminéralisation osseuse ou traiter l'ostéoporose.<sup>7-12</sup> L'ostéoporose peut également résulter d'un volume maximal et inadéquat du tissu osseux atteint pendant les années de croissance, d'un déséquilibre du remaniement osseux dû à l'âge, présentant un excès de résorption significatif et un certain nombre de conditions cliniques et traitements qui induisent l'ostéopénie ou des déséquilibres du remaniement osseux.<sup>7</sup> Ces derniers incluent les maladies endocriniennes telles que l'hypogonadisme, l'hyperthyroïdie, l'hyperparathyroïdisme, et l'hypercortisolisme ; les maladies gastrointestinales liées à la nutrition et au métabolisme minéral ; les maladies des tissus conjonctifs ;

### APPLICATION

Le MicroVue DPD est un dosage urinaire qui fournit une mesure quantitative de l'excrétion des liaisons croisées désoxypyridinoline (DPD) comme indicateur de la résorption osseuse. Les taux élevés de DPD urinaire sont indicateurs d'une résorption osseuse élevée chez les personnes. La mesure de la DPD est destinée comme aide à la surveillance des changements de résorption osseuse chez les femmes ménopausées sous traitement hormonal ou traitement avec un bisphosphonate inhibiteur de la résorption osseuse et chez les personnes diagnostiquées atteintes d'ostéoporose.

le myélome multiple ; l'immobilisation chronique, l'alcoolisme, l'usage du tabac ; et le traitement chronique à l'héparine ou aux corticostéroïdes.<sup>7</sup> Les autres maladies qui se caractérisent par un remaniement osseux anormal incluent la maladie de Paget et les ostéosarcomes métastatiques.<sup>3</sup>

Pour le dosage de DPD MicroVue, on a employé une technologie à base d'anticorps pour produire un anticorps monoclonal démontrant la spécificité de la DPD.<sup>13</sup> La spécificité de l'anticorps monoclonal utilisé dans le dosage de DPD MicroVue permet une quantification simple, pratique, reproductible et directe de la DPD dans l'urine.

## PRINCIPE DU PROCÉDÉ

Le dosage de DPD MicroVue est un essai immunoenzymatique par compétition sous forme de plaque de microtitration à puits employant un anticorps monoclonal anti-DPD enduit sur la plaque de façon à capturer le DPD. La DPD de l'échantillon entre en compétition avec la DPD-alcaline phosphatase conjuguée pour l'anticorps, et la réaction est détectée à l'aide d'un substrat pNPP. Les résultats de DPD MicroVue sont corrigés pour la concentration urinaire en créatinine.

## RÉACTIFS ET MATÉRIAUX FOURNIS

### 96 dosages pour liaisons croisées désoxypyridinoline

L'EIA de DPD MicroVue contient les éléments suivants :

<b>A</b>		
<b>B</b>	<b>Solutions étalon de DPD A à F</b>	
<b>C</b>	Articles 4203 à 4208	de 0,3 mL chacun
<b>D</b>	(A = 0, B = 3, C = 10, D = 30, E = 100, F = 300 nmol/L DPD)	
<b>E</b>	DPD d'os de bovin purifiée dans 10 mmol/L d'acide phosphorique	
<b>F</b>	contenant de l'azote de sodium (0,05 %) comme conservateur	
<b>L</b>	<b>Solutions témoin à concentration faibles/élevées</b>	
<b>H</b>	Articles 4209, 4210	de 0,3 mL chacun
	DPD d'os bovin purifiée dans 10 mmol/L d'acide phosphorique	
	contenant de l'azote de sodium (0,05 %) comme conservateur	
<b>1</b>	<b>Plaques enduites</b>	<b>Article 4661 12 chacun</b>
	Anticorps monoclonal de souris anti-DPD purifié, absorbé par les puits de la microplaque	
<b>2</b>	<b>Solution d'arrêt</b>	<b>Article 4702 15 mL</b>
	NaOH 0,5N	
<b>3</b>	<b>Tampon de lavage X10</b>	<b>Article 4703 55 mL</b>
	Détergent non-ionique dans une solution tampon contenant de l'azote de sodium (0,05 %) comme conservateur	
<b>4</b>	<b>Tampon d'essai</b>	<b>Article 4704 55 mL</b>
	Détergent non-ionique dans une solution tampon contenant de l'azote de sodium (0,05 %) comme conservateur	
<b>5</b>	<b>Substrat tampon</b>	<b>Article 4705 3 x 10 mL</b>
	Une solution de diéthanolamine et chlorure de magnésium contenant de l'azote de sodium (0,05 %) comme conservateur	
<b>6</b>	<b>Substrat en comprimés</b>	<b>Article 0012 3 x 20 mg</b>
	p-Nitrophényl phosphate	
<b>7</b>	<b>Conjugué enzymatique</b>	<b>Article 4202 3 chacun</b>
	DPD lyophilisée, purifiée d'os bovin, conjugué à la phosphatase alcaline contenant des sels tampons et des stabilisants	
	<b>Couvercle adhésif de plaque</b>	
	Article 0047	3 chacun

## MATÉRIAUX NÉCESSAIRES NON FOURNIS

- Micropipettes pour l'injection de 50 à 300 µL
- Éléments appropriés à la mesure de 7 à 300 mL de liquide
- Récipient pour dilution de tampon de lavage
- Tubes pour dilution d'échantillons, de solutions étalon et témoin
- Eau dé-ionisée ou distillée
- Lecteur de plaque capable de lire à 405 nm
- Logiciel avec ajustement des courbes à étalonnage en 4 dimensions
- Valeurs de la créatinine (mmol/L) pour les prélèvements d'urine

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Pour diagnostic *in vitro*.
2. Traiter tous les prélèvements d'échantillons comme du matériel potentiellement nocif. Suivre les précautions standard lors de la manipulation du contenu de ce trousseau et de tous les échantillons de patients.
3. Éliminer les récipients et leur contenu inutilisés conformément aux dispositions réglementaires du gouvernement fédéral, de l'Etat et de la localité.
4. Utiliser les réactifs fournis intégralement avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette de l'emballage.
5. Porter un vêtement, des gants et un appareil de protection des yeux /du visage appropriés lors de la manipulation du contenu de ce trousseau.
6. Suivre les recommandations concernant la conservation des réactifs de l'essai .
7. Ne pas utiliser les plaques enduites si la poche est percée.
8. Tester chaque échantillon en double.
9. Le NaOH 0,5N est considéré corrosif et peut provoquer des brûlures graves. Ne pas ingérer. Éviter le contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. En cas de contact, laver à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
10. L'azote de sodium est utilisé comme conservateur. Un contact accidentel ou une ingestion de tampons contenant de l'azote de sodium peut provoquer une irritation de la peau, des yeux, ou de la bouche. Utiliser les tampons uniquement à des fins prévues et éviter le contact avec les acides. L'azote de sodium peut réagir avec les conduites en plomb et en cuivre pour former des azides métalliques très explosifs. Lors de la mise au rebut, rincer à grande eau pour éviter une accumulation d'azote.
11. Le tampon de substrat contient du 2,2'-iminodiéthanol et peut causer des irritations aux yeux et/ou sur la peau en cas de contact prolongé. Porter un vêtement, des gants et un appareil de protection des yeux /du visage appropriés. Les zones ayant été en contact avec le produit doivent être rincées immédiatement à l'eau et au savon.
12. Les solutions étalon et témoin sont dans 10 mmol/L d'acide phosphorique. Éviter le contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. Ne pas ingérer. En cas de contact, laver à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
13. L'utilisation de pipettes multi-canaux ou de robots pipetteurs est recommandée pour assurer la distribution rapide des réactifs.

14. Pour une mesure exacte des échantillons, ajouter les échantillons et les solutions étalon avec précision. Pipetter avec soin, en utilisant uniquement un équipement étalonné.
15. Diluer les échantillons supérieurs à 300 nmol/L dans le tampon essai et tester à nouveau. Inclure le facteur de dilution dans le calcul final.
16. Cet essai peut être effectué avec n'importe quelle méthode de lavage validée.
17. Les solutions étalon, témoin et le conjugué enzymatique de la désoxypyridinoline sont sensibles à la lumière. Eviter une exposition prolongée à la lumière, en particulier les rayons de soleil directs ou indirects. Conserver les réactifs dans l'obscurité lorsqu'ils ne sont pas utilisés. Les échantillons et les réactifs ne sont pas considérablement affectés par la lumière normale, artificielle de laboratoire, lorsqu'ils sont manipulés conformément aux instructions du *PROCÉDÉ DE L'ESSAI*.
18. Si la température ambiante ne peut pas être maintenue entre 20 et 28 °C et qu'une absorbance de > 2,0 n'est pas compatible avec votre lecteur de plaque, surveiller la formation de substrat dans les puits A de la solution étalon ; arrêter la réaction quand la densité optique atteint 1,2 à 1,5 ; puis lire les plaques.

## PRÉPARATION DES RÉACTIFS

### Tampon de lavage - Se référer aux notes de la section *PROCÉDÉ DE L'ESSAI*

Préparer la quantité nécessaire de tampon de lavage 1X (voir tableau de la section *PROCÉDÉ DE L'ESSAI*) en diluant 10X le concentré de lavage à 1/10 avec de l'eau dé-ionisée. Conserver entre 20 et 28 °C. Utiliser le tampon de lavage 1X dans les 21 jours de préparation.

**Instructions de lavage spéciales :** Préparer un tampon de lavage 1X comme décrit ci dessus, et le conserver à 2 à 8 °C jusqu'à son utilisation.

### Conjugué enzymatique

Préparer le conjugué enzymatique dans un délai de 2 heures d'utilisation. Reconstituer chaque flacon de conjugué enzymatique nécessaire (voir tableau) avec 7 mL de tampon essai. Conserver le conjugué enzymatique reconstitué à 2 à 8 °C jusqu'à son utilisation.

### Solution de substrat active

Le substrat tampon doit être porté à une température de 20 à 28 °C avant le début du dosage. (Une période de deux heures à une nuit est recommandée.) Préparer la solution de substrat active dans un délai d'une heure d'utilisation. Placer un comprimé de substrat dans chaque flacon nécessaire de substrat tampon à 20–28 °C (voir tableau). Attendre 30 à 60 minutes jusqu'à dissolution du(des) comprimé(s). Secouer le(s) flacon(s) énergiquement pour mélanger complètement.

## CONSERVATION

**Conserver le trousseau à une température de 2 à 8 °C.**

**Ne pas congeler.**

**Conserver les réactifs inutilisés à 2 à 8 °C.**

## PRÉLÈVEMENT DE SPÉCIMENS ET CONSERVATION

Le dosage de DPD MicroVue peut être effectué à l'aide de prélèvements d'urine sans conservateur à la première miction du matin ou à la seconde miction du matin. Il est recommandé de procéder aux prélèvements avant 10 h du matin pour remédier à toute influence potentielle de variations nocturnes. Conserver l'échantillon d'urine réfrigéré (2–8°C) et le mettre à l'abri pendant moins de 7 jours, ou congeler l'échantillon à ≤ -20 °C pour le garder plus longtemps. Ne pas soumettre les échantillons à plus de 5 cycles de congélation/ décongélation. Eviter toute exposition prolongée à la lumière, en particulier au soleil. Pendant le traitement de routine, les échantillons ne sont pas affectés par la lumière normale, artificielle de laboratoire.

Lors de la surveillance d'un traitement, prélever des échantillons de base avant de commencer le traitement. Pour comparaison ultérieure, prélever l'(es) échantillon(s) au même moment de la journée que l'échantillon de base.

## PROCÉDÉ DE L'ESSAI

**Lire la notice du produit dans son intégralité avant de commencer l'essai**

Voir *PRÉPARATION DES RÉACTIFS* avant de poursuivre.

**NOTE CONCERNANT LA PROCEDURE :** Le dosage de DPD MicroVue est sensible aux conditions de lavage.

**L'étape de lavage complète** doit être réalisée **dans un délai de 2 minutes**. **Si l'étape de lavage NE PEUT PAS être réalisée dans un délai de 2 minutes, suivre les Instructions de lavage spéciales situées aux sections PRÉPARATION DU RÉACTIF et Etape du lavage.**

**Déterminer la quantité de chaque réactif nécessaire pour le nombre de plaques à utiliser.**

Quantité de plaques	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
Quantité d'échantillons (testés en double)	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>40</b>
Conjugué enzymatique (flacon)	1	1	2*	2*
Substrat (flacon)	1	1	2*	2*
Tampon de lavage 1X (mL)	100	150	200	300

\* Lorsque plus d'un flacon ou d'une fiole est utilisé, associé les contenus et mélanger avant d'utiliser.

### Incubation de l'échantillon / du conjugué enzymatique

1. Diluer les échantillons, solutions étalon et solutions témoin à 1/10 avec le tampon essai (par ex. 50 µL d'échantillon + 450 µL de tampon essai).
2. Retirer le support des puits de la plaque de microtitration et le nombre nécessaire de plaques enduites de la poche (voir tableau). S'assurer que la poche contenant toutes les plaques inutilisées est complètement fermée.
3. Placer le nombre désiré de plaques enduites dans le support des puits. Libeller les plaques pour éviter de les confondre en cas de retrait accidentel du support des puits.
4. Ajouter 50 µL de solution étalon, solution témoin ou échantillon dilué dans chaque puits des plaques enduites. Cette étape doit être réalisée dans un délai de 30 minutes.

5. Préparer le conjugué enzymatique dans un délai de 2 heures d'utilisation. Reconstituer chaque flacon de conjugué enzymatique nécessaire (voir tableau) avec 7 mL de tampon essai. Conserver le conjugué enzymatique reconstitué entre 2 et 8 °C jusqu'à son utilisation.
6. Ajouter 100 µL de conjugué enzymatique reconstitué à chaque puits. Recouvrir les plaques avec le couvercle adhésif fourni. Incuber pendant 2 heures (± 5 minutes) à 2–8 °C. Cette incubation doit être effectuée dans l'obscurité.
7. Préparer la solution de substrat active dans un délai d'une heure d'utilisation. Placer un comprimé de substrat dans chaque flacon nécessaire de substrat tampon à 20–28 °C (voir tableau). Attendre 30 à 60 minutes jusqu'à dissolution du(des) comprimé(s). Secouer le(s) flacon(s) énergiquement pour mélanger complètement.

#### Etape du lavage

8. Préparer la quantité nécessaire de tampon de lavage 1X (voir tableau) en diluant 10X le tampon de lavage à 1/10 avec de l'eau dé-ionisée. Inverser/vider manuellement les plaques. Ajouter au moins 250 µL de tampon de lavage 1X à chaque puits, et inverser/vider manuellement les plaques. Répéter cette opération deux fois pour arriver à un total de trois lavages. Décanter énergiquement les plaques à sec sur des serviettes en papier après le dernier lavage. Pendant que les plaques sont à l'envers, nettoyer soigneusement le fond des plaques avec un essuie-tout non pelucheux pour s'assurer que le fond des plaques est propre.

**Instructions de lavage spéciales :** Effectuer l'étape du lavage selon la procédure décrite ci-dessus, en utilisant un tampon de lavage 1X froid (2 à 8 °C). Après chaque lavage, laisser les plaques sécher pendant 5 à 10 minutes sur des serviettes en papier avant d'ajouter le substrat.

#### Incubation du substrat

9. Ajouter 150 µL de solution de substrat active à chaque puits.
10. Incuber pendant 60 minutes (± 5 minutes) à 20 - 28 °C.

#### Arrêt/Lecture

11. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt à chaque puits. Ajouter la solution d'arrêt selon le même modèle et les mêmes intervalles de temps que pour l'ajout de la solution de substrat.
12. Lire la densité optique à 405 nm. S'assurer qu'aucune grosse bulle ne soit présente dans les puits et que les fonds de plaques soient propres. Les plaques doivent être lues dans les **15 minutes** suivant l'ajout de la solution d'arrêt.
13. Un logiciel de quantification avec une équation d'ajustement des courbes à étalonnage quadratique doit être utilisé pour analyser les résultats de la DPD du dosage MicroVue.

$$\text{Equation : } y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$$

14. Déterminer la concentration d'échantillons et de solutions témoin à partir de la courbe de concordance.
15. Les valeurs de contrôle doivent être situées dans la plage spécifiée dans le certificat d'analyse fourni avec le trousseau.

### CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le certificat d'analyse compris dans ce trousseau est spécialement conçu pour le lot, et doit être utilisé pour vérifier que les résultats obtenus par votre laboratoire sont semblables à ceux obtenus à Quidel Corporation. Les valeurs de densité optique sont fournies, et elles doivent être utilisées comme référence uniquement. Les résultats obtenus par votre laboratoire peuvent être différents.

Les plages de contrôle de qualité sont fournies. Les valeurs de contrôle sont destinées à vérifier la validité du tracé et les résultats de l'échantillon. Chaque laboratoire devrait établir ces propres paramètres en matière de limites d'essais acceptables. Si les valeurs de contrôle ne sont PAS dans les limites d'acceptation de votre laboratoire, les résultats de l'essai doivent être remis en question, et les prélèvements recommencés.

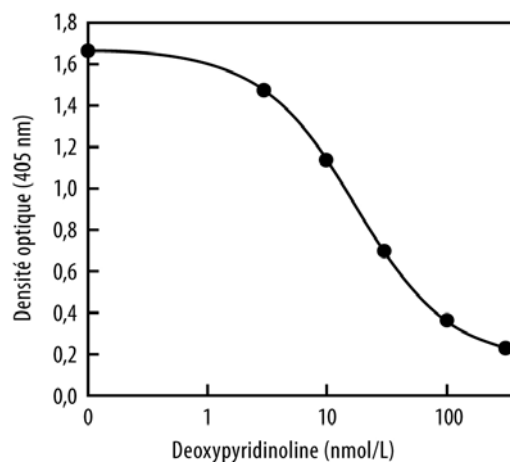
Si la densité optique de la solution étalon A de la DPD MicroVue est inférieure à 0,8, les résultats doivent être remis en question, et les prélèvements recommencés.

### INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus à partir du dosage de DPD MicroVue doivent être corrigés pour les variations en concentration urinaire en divisant la valeur de DPD (nmol/L) par la valeur de la créatinine (mmol/L) de chaque échantillon (créatinine en mg/dL x 0,088 = mmol/L). Les résultats finaux de DPD MicroVue sont exprimés comme nmol de DPD / mmol de créatinine.

#### Courbe de concordance représentative

Taux standard de DPD : 0, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/L



## LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

Même si la DPD MicroVue est utilisée comme indicateur de la résorption osseuse, l'utilité de ce test n'a pas été établie, et ne permet donc pas de prédire quelle sera l'évolution de l'ostéoporose ou le risque ultérieur de fractures. L'utilité de ce test n'a pas été établie pour l'hyperparathyroïdisme ou l'hyperthyroïdie. En utilisant la DPD MicroVue pour surveiller le traitement, les résultats peuvent être déroutants chez les patients affligés par des pathologies cliniques connues pour affecter la résorption osseuse, par ex. les ostéosarcomes, en plus des maladies et pathologies énumérées ci-dessus. Les résultats de DPD MicroVue doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques et autres résultats de diagnostic, et ils ne doivent pas être utilisés comme seul facteur déterminant de commencement ou de changement de traitement.

## VALEURS D'ÉCHANTILLON

Des plages de référence de DPD MicroVue ont été établies pour des hommes (n = 121) et des femmes non ménopausées (n = 312) en bonne santé et de plus de 25 ans. Dans l'optique d'établir des plages de référence, les sujets en bonne santé ont été définis comme :

- Fondamentalement sains, sans trouble osseux, endocrinien, ou chronique
- Cycles menstruels réguliers (femmes)
- Pas enceinte ou allaitante (femmes)
- N'étant pas actuellement sous prise de tout médicament connu pour affecter le métabolisme osseux (par ex. les corticostéroïdes, les analogues de la gonadolibérine, les anticonvulsivants, l'héparine, les médicaments utilisés pour traiter l'hyperthyroïdie)

Les valeurs peuvent être influencées par des facteurs tels que la faible production d'œstrogènes, un apport faible en calcium ou une activité physique limitée, ou des maladies connues pour affecter le métabolisme osseux, telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget, l'hyperparathyroïdisme, l'hyperthyroïdie et les ostéosarcomes. La carence en œstrogènes chez les femmes ménopausées peut être à l'origine d'une résorption osseuse élevée. Il est suggéré d'utiliser la plage de référence pré-ménopause pour interpréter les résultats chez les femmes ménopausées. Chaque laboratoire devrait établir sa propre plage de référence standard. Les plages sont exprimées en tant qu'intervalles de référence non paramétriques (IC de 90 %).

	Age (An)	Moyenne	Ecart type	Plage (nmol DPD/mmol Cr)
Femmes	25 - 44	5,0	1,4	3,0 - 7,4
Hommes	25 - 55	3,8	1,0	2,3 - 5,4

La variabilité anticipée pour un même sujet a été déterminée à partir d'échantillons d'urine prélevés sur 49 sujets en bonne santé pendant cinq jours non consécutifs, sur deux semaines. La moyenne de la variation longitudinale individuelle d'un sujet était de 15,5 %. La variabilité entre sujets se traduit par les intervalles de référence non paramétriques indiqués ci-dessus.

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

### Spécifications anticorps

L'anticorps monoclonal anti-DPD présente de fortes affinités sélectives, pour la DPD libre et les liaisons négligeables aux peptides de DPD, ainsi que la pyridinoline (PYD) libre, ou conjuguée à des peptides.

	% de réactivité
DPD libre	100 %
PYD libre	< 1 %
Peptides de PYD/DPD	
≥ 1000 MW	< 2,5 %
≥ 3500 MW	< 2,5 %

### Sensibilité

La limite de détection minimale du dosage de la DPD MicroVue est de 1,1 nmol/L, et est déterminée par la limite supérieure à 3 écarts types d'un essai de précision utilisant zéro comme étalon, est de 1,1 U/L.

### Récupération - Récupération maximale

La récupération maximale a été déterminée par l'ajout d'une quantité connue DPD purifiée aux prélèvements d'urine à différents niveaux de la DPD d'origine endogène. Des résultats types sont fournis ci-dessous.

Echantillon	Endogène (nmol/L)	Ajouté (nmol/L)	Observé (nmol/L)	Récupération (%)
1	3,1	27,3	32,0	106
2	11,2	27,3	38,8	101
3	18,2	27,3	44,9	98

### Récupération - Linéarité

La linéarité a été déterminée en diluant des échantillons en série et en comparant les valeurs observées avec les valeurs anticipées. Des résultats types sont fournis ci-dessous.

Echantillon	Facteur de dilution	Observé (nmol/L)	Anticipé (nmol/L)	Récupération (%)
1	pur	65,5	-	-
	1:2	31,8	32,8	97
	1:4	15,4	16,4	94
2	pur	84,6	-	-
	1:2	39,3	42,3	93
	1:4	19,4	21,1	92
3	pur	132,6	-	-
	1:2	65,6	66,3	99
	1:4	30,2	33,2	91
	1:8	16,8	16,6	101

### Précision

En cours de phase, on a déterminé la précision en testant un minimum de 21 réplicats de 3 prélèvements sur 2 plaques provenant de chacun des 3 lots de kit (soit 6 plaques au total). Entre les phases, la précision a été établie par l'analyse de 3 prélèvements sur 9 plaques différentes provenant de chacun des 3 lots de kit (soit 27 plaques au total). Les échantillons ci-dessous représentent une plage de valeurs nmol/L. Pour une femme présentant un taux de créatinine de 4,5 mmol/L, les échantillons 1 à 3 représentent une résorption normale faible, normale élevée, et élevée (de 2,4 nmol/mmol, 6,7 nmol/mmol, et 38,8 nmol/mmol, respectivement).

Echantillon	DPD (DPD nmol/L)	En cours de phase <sup>1</sup> CV %	Entre les phases <sup>2</sup> CV %
1	10,7	8,4	4,8
2	30,0	4,3	4,6
3	174,7	5,5	3,1

<sup>1</sup> n = 21      <sup>2</sup> n = 9 phases

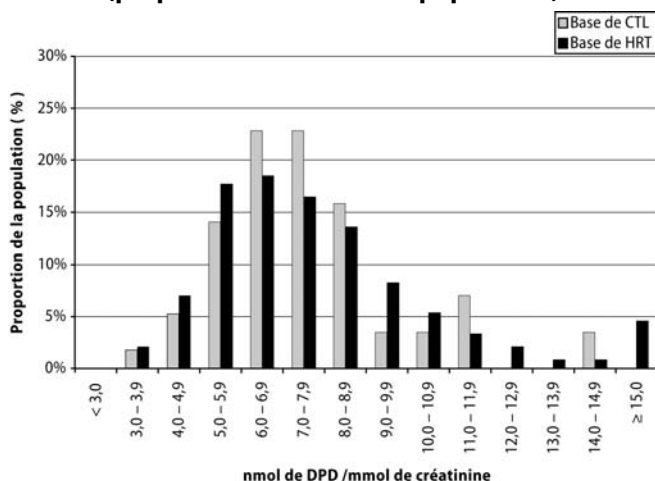
## ESSAIS CLINIQUES

### Utilisation de DPD MicroVue pour la surveillance du traitement hormonal par inhibiteurs de la résorption osseuse chez les femmes ménopausées

Un essai randomisé multicentrique a prouvé la fiabilité et l'efficacité du dosage de DPD MicroVue en matière de surveillance des changements d'excrétion urinaire de DPD associée au traitement par œstrogènes/progestatifs, des inhibiteurs de la résorption osseuse. L'augmentation de la résorption osseuse et la déminéralisation importante sont souvent associées à la carence en œstrogènes suivant la ménopause. La substitution d'œstrogènes s'est révélée comme facteur d'accroissement considérable de la résorption osseuse et de protection de la masse osseuse existante.<sup>7-10</sup> Les sujets étaient des femmes ménopausées, âgées de 45 à 64 ans (en moyenne de 56 ± 4 ans), qui avaient subi une ménopause naturelle ou chirurgicale au cours des 10 dernières années. A la base, les sujets admissibles ont été randomisés, soit dans un groupe de traitement actif (THS) : Premarin® (0,625 mg par jour) avec un progestatif placebo, Premarin (0,625 mg par jour) et un progestatif actif (Provera® 2,5 mg/jour en continu, Provera 10 mg/jour en alternance, ou une progestérone micronisée 200 mg/jour en alternance) ; soit dans le groupe témoin (CTL) : œstrogène placebo et progestatif placebo. Les prélèvements matinaux d'urine à la première ou seconde miction furent obtenus de tous les sujets à la base et après 12 mois. Les résultats de DPD MicroVue ont été corrigés pour la clairance de la créatinine et exprimés comme nmol de DPD/mmol de créatinine.

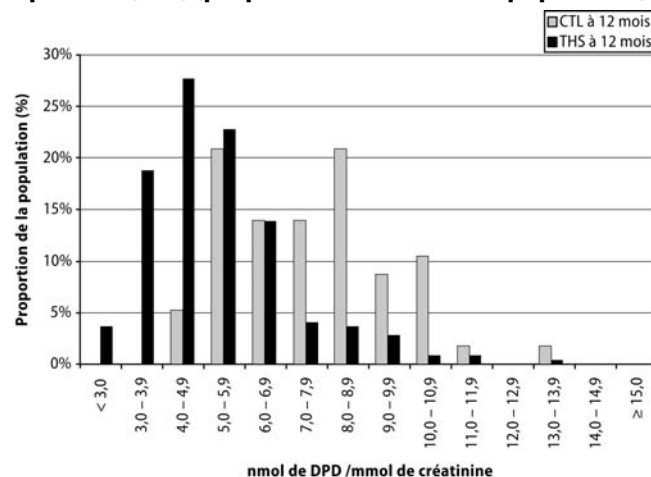
La moyenne initiale de base (± 1 écart type) de la concentration en DPD (7,56 ± 2,27 vs. 7,94 ± 3,25 nmol/mmol, p = 0,304) et la DMO de la colonne lombaire (0,97 ± 0,17 vs. 0,97 ± 0,15 g/cm<sup>2</sup>, p = 0,792) étaient semblables pour CTL et THS. La répartition des valeurs de départ de la DPD dans le THS et CTL est illustrée dans le schéma 1, proportionnellement à la population étudiée.

**Schéma 1 : Répartition des taux de DPD de base (proportionnellement à la population)**



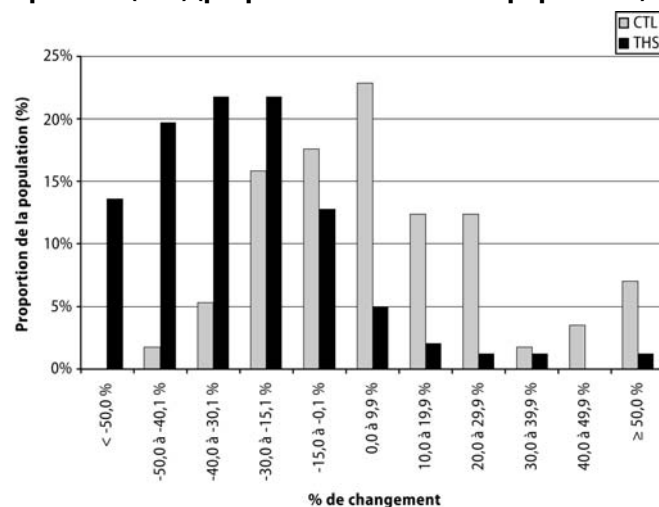
La DPD était nettement inférieure pour le THS que le CTL à 12 mois (5,27 ± 1,78 vs. 8,08 ± 3,63 nmol/mmol, p < 0,00001). A 12 mois les sujets du groupe THS étaient plus susceptibles que les sujets du CTL de présenter une concentration en DPD de ≤ 7,4 nmol/mmol (89 % vs. 51 %, p < 0,00001) bien que les proportions de base étaient similaires pour les 2 groupes (CTL 56 %, THS 53 %, ≤ 7,4 nmol/mmol). La répartition des valeurs de DPD après 12 mois dans les groupes THS et CTL est illustrée dans le schéma 2.

**Schéma 2 : Répartition des taux de DPD après 12 mois de Traitement par œstrogènes/progestatifs (THS) ou placebo (CTL) (proportionnellement à la population)**



La concentration moyenne (± 1 écart type) en DPD chez les sujets du CTL a légèrement augmenté de +11,7 % (± 49,7 %) par rapport à la valeur initiale de base à 12 mois (p = 0,278), alors que les concentrations en DPD chez les sujets du THS ont diminué de -29,1 ± 23,8 % par rapport à la ligne de base à 12 mois (p < 0,0001). La répartition du pourcentage de changement des valeurs de DPD par rapport à la ligne de base après 12 mois dans les groupes THS et CTL est illustrée dans le schéma 3.

**Schéma 3 : Répartition du pourcentage de changement des taux de DPD après 12 mois de traitement par œstrogènes/progestatifs (THS) ou placebo (CTL) (proportionnellement à la population)**



A 12 mois, la DMO de la colonne lombaire des sujets du groupe THS avait augmenté par rapport au groupe CTL ( $p < 0,00001$ ), comme l'indique le tableau 1.

**Tableau 1. Changements de la DMO de la colonne lombaire (Moyenne ± Ecart type)**

	n	Ligne de base (g/cm <sup>2</sup> )	12 mois (g/cm <sup>2</sup> )	Δ (%)
CTL	57	0,97 ± 0,17	0,95 ± 0,17	-1,6 ± 2,7
THS	244	0,97 ± 0,15	1,01 ± 0,15	+3,7 ± 2,7

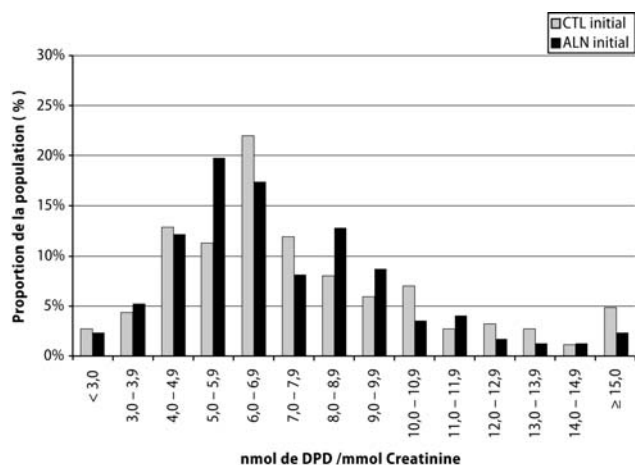
Ces résultats indiquent que le dosage de DPD MicroVue est fiable et efficace pour la surveillance de l'effet inhibiteur de la résorption du traitement hormonal de substitution chez les femmes ménopausées.

### Utilisation de DPD MicroVue pour la surveillance du traitement avec un bisphosphonate inhibiteur pour l'ostéoporose

Un essai randomisé multicentrique a prouvé la fiabilité et l'efficacité du dosage de DPD MicroVue en matière de surveillance des changements d'excrétion urinaire associée au traitement par aminobisphosphonates (alendronate), des inhibiteurs de la résorption osseuses. Les sujets étaient des femmes ménopausées, âgées de 45 à 84 ans (en moyenne de 64 ± 7 ans), chez lesquelles on a détecté l'ostéoporose (en se basant sur un tableau clinique ou une densité minérale osseuse [DMO] de la colonne lombaire initiale, plus de 2,5 écarts type en dessous de la moyenne pour les femmes d'âge mûr non ménopausées). A la base, on a randomisé les sujets admissibles, et administré, soit 10 mg d'alendronate et 500 mg de calcium par jour (ALN), soit 500 mg de calcium pour jour (CTL). Les prélèvements d'urine à la première miction furent obtenus de tous les sujets à la ligne de base, à 3, 6 et 12 mois. Les résultats de DPD MicroVue ont été corrigés pour la clairance de la créatinine et exprimés comme nmol de DPD/mmol de créatinine.

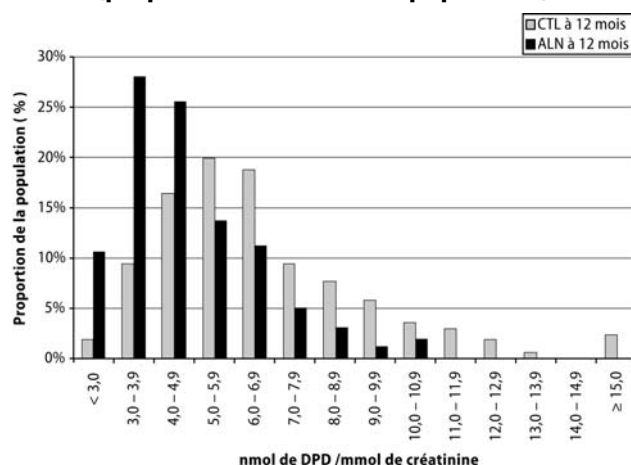
La moyenne initiale de base (± 1 écart type) de la concentration en DPD (7,35 ± 3,30 vs. 7,74 ± 3,47 nmol/mmol,  $p = 0,278$ ) et la DMO de la colonne lombaire (0,75 ± 0,09 vs. 0,74 ± 0,10 g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,426$ ) étaient semblables pour ALN et CTL. La répartition des valeurs de départ de la DPD dans les groupes ALN et CTL est illustrée dans le schéma 4, proportionnellement à la population étudiée.

**Schéma 4 : Répartition des taux de DPD de base (proportionnellement à la population)**



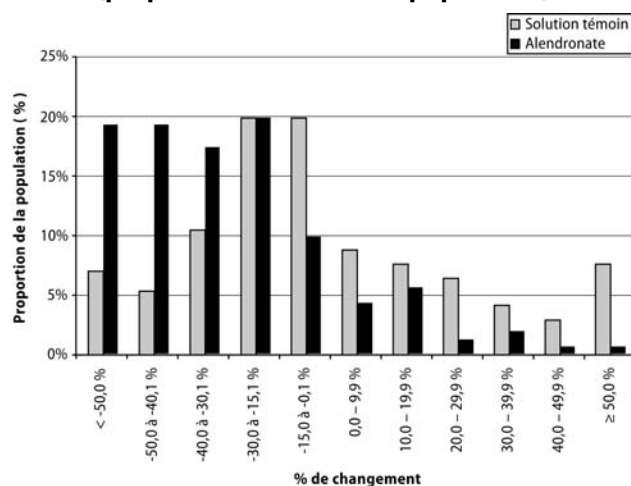
La DPD de l'ALN était nettement inférieure au CTL à 3 (5,45 ± 2,61 vs. 7,56 ± 3,08 nmol/mmol,  $p < 0,00001$ ), 6 (4,83 ± 1,94 vs. 7,09 ± 3,33 nmol/mmol,  $p < 0,00001$ ), et 12 mois (4,78 ± 1,75 vs. 6,73 ± 2,98 nmol/mmol,  $p < 0,00001$ ). A 3, 6, et 12 mois, respectivement 84, 89, et 91 % des sujets de l'ALN présentaient une concentration en DPD ≤ 7,4 nmol/mmol. Les sujets du groupe ALN étaient plus susceptibles que les sujets du CTL de présenter une concentration en DPD de ≤ 7,4 nmol/mmol à tout moment ( $p = 0,002$ ) bien que les proportions de base étaient similaires pour les 2 groupes (CTL 60,4%, THS 57,8%, ≤ 7,4 nmol/mmol, respectivement). La répartition des valeurs de DPD après 12 mois dans les groupes ALN et CTL est illustrée dans le schéma 5.

**Schéma 5 : Répartition des taux de DPD après 12 mois de traitement par Alendronate (ALN) ou Calcium(CTL) (proportionnellement à la population)**



La concentration moyenne (± 1 écart type) en DPD chez les sujets sous CTL est graduellement diminué par rapport à la ligne de base jusqu'à -4,9 % (± 34,9 %) à 12 mois ( $p = 0,003$ ), ce qui peut refléter l'effet modeste de préservation de l'os par le calcium.<sup>15</sup> Les concentrations moyennes de DPD chez les sujets de l'ALN ont diminué de 22,9 ± 37,4 % à 3 mois, 28,6 ± 25,8 % à 6 mois, et 29,5 ± 26,7 % à 12 mois. La répartition du pourcentage de changement des valeurs de DPD par rapport à la ligne de base après 12 mois dans les groupes ALN et CTL est illustrée dans le schéma 6.

**Schéma 6 : Répartition du pourcentage de changement des taux de DPD après 12 mois de traitement par Alendronate (ALN) ou Calcium (CTL) (proportionnellement à la population)**



A 12 mois, la DMO de la colonne lombaire des sujets du groupe ALN avait augmenté par rapport au groupe CTL ( $p < 0,00001$ ), comme l'indique le tableau 2.

**Tableau 2. Changements de la DMO de la colonne lombaire (Moyenne  $\pm$  Ecart type)**

	n	Ligne de base (g/cm <sup>2</sup> )	12 mois (g/cm <sup>2</sup> )	$\Delta$ (%)
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

Ces résultats indiquent que le dosage de DPD MicroVue est fiable et efficace pour la surveillance de l'effet du traitement par inhibiteurs de la résorption de l'aminobisphosphonate (alendronate) parmi les sujets diagnostiqués souffrant d'ostéoporose.

### Essais supplémentaires

Des essais cliniques ont été effectués pour évaluer les taux de désoxypyridinoline dans l'urine, obtenus à l'aide du dosage DPD MicroVue relevant des taux obtenus par l'analyse de CLHP<sup>14</sup> et le diagnostic clinique.

Le premier de ces essais fut mené dans des centres de recherche clinique, à l'aide de 54 échantillons de volontaires en bonne santé et de 140 échantillons de patients présentant des troubles osseux (y compris l'ostéoporose, la maladie de Paget, l'hyperparathyroïdisme et l'hyperthyroïdie). Ces maladies impliquent souvent une résorption osseuse élevée, et ce groupe de sujets fut considéré comme population à risque. Une résorption osseuse élevée n'était toutefois pas anticipée chez tous les patients au moment du prélèvement des échantillons. Cent trois des 140 patients chez lesquels un trouble avait été diagnostiqué ne présentaient pas de valeurs de pyridinoline élevée, comme l'indique la mesure de la CLHP. Les valeurs de désoxypyridinoline DPD MicroVue des sujets en bonne santé se situaient entre 2,3 et 11,2 nmol/mmol et variaient de 1,2 à 37,3 nmol/mmol chez les patients.

Dans l'essai, le dosage de DPD MicroVue a été comparé à une méthode de recherche par CLHP<sup>14</sup> pour la mesure de la pyridinoline. Le seuil de CLHP, d'un essai sur 84 sujets adultes sains, s'est révélé être de 50 nmol/mmol pour les hommes et de 60 nmol/mmol pour les femmes (limite maximale de 95 % d'intervalle confiance pour chaque sexe). En utilisant la pyridinoline élevée déterminée par CLHP comme méthode de classification, on a utilisé la technique de fonction d'efficacité de l'observateur pour définir une sensibilité relative optimale et spécificité au sein de la population décrite. Les sensibilité et spécificité relatives sont présentées dans le tableau 3. Un tableau d'étude comparatif de sensibilité aux hypothèses indiquant le nombre de sujets dans chaque classification figure dans le schéma 7.

**Tableau 3**

MicroVue DPD	
Sensibilité Relative	69 %
Spécificité	87 %

**Schéma 7**

		CLHP Elevée +	PYD Non élevée -
MicroVue DPD	+	31	20
	-	14	129

Dans le deuxième essai, les résultats de la DPD du dosage MicroVue furent comparés sur une population mixte de 39 échantillons provenant de sujets en bonne santé et de 69 échantillons de patients souffrant de la maladie de Paget. Bien que la maladie de Paget représente un modèle d'identification de la résorption osseuse active, certains patients de cet essai subissaient un traitement ou ont pu être considérés être en rémission, et il est possible qu'ils n'aient pas eu de résorption osseuse élevée au moment du prélèvement des échantillons. Dans cet essai, les sujets en bonne santé se situaient entre 2,3 et 6,4 nmol/mmol. Les patients atteints de la maladie de Paget se situaient entre 1,7 et 50,4 nmol/mmol.

En se servant du diagnostic de la maladie de Paget comme méthode de classification, on a utilisé la technique de fonction d'efficacité de l'observateur pour définir une sensibilité relative optimale et spécificité au sein de cette population. La sensibilité relative et spécificité sont indiquées dans le tableau 4. Un tableau d'étude comparatif de sensibilité aux hypothèses figure dans le schéma 8.

**Tableau 4**

MicroVue DPD	
Sensibilité Relative	91 %
Spécificité	97 %

**Schéma 8**

		Oui	Non
MicroVue DPD	+	63	1
	-	6	38

## ASSISTANCE

Pour des services en dehors des Etats-Unis, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

Couvert par les brevets américains N° : 5,620,861, 5,700,694, 6,121,002, et 5,283,197

## RÉFÉRENCES

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.

## GLOSSAIRE



Consulter les instructions d'utilisation au CDROM



Application

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



Quidel Corporation | 10165 McKellar Court  
San Diego, CA 92121 USA | [www.quidel.com](http://www.quidel.com)



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany