

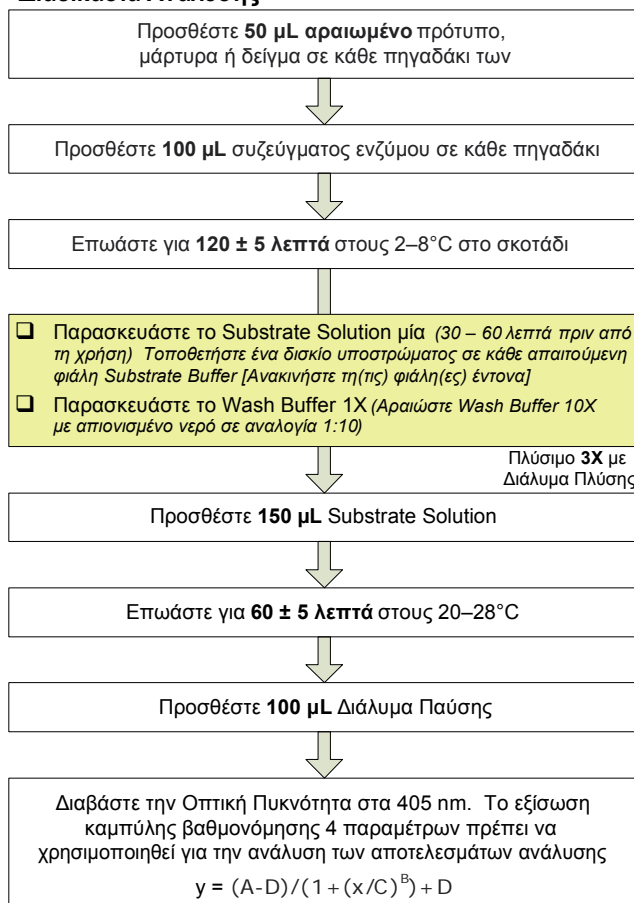
Ανοσοπροσδιορισμός ενζύμου για τον ποσοτικό προσδιορισμό διασταυρώσεων δεοξυπυριδινολίνης (DPD) στα ανθρώπινα ούρα

MicroVue™ DPD EIA Περίληψη

Προετοιμασία Αντιδραστηρίων Και Δειγμάτων

- ❑ Παρασκευάστε σύζευγμα ενζύμου με Assay Buffer; αποθηκεύστε στους 2–8°C. (7 mL κρύο Assay Buffer για κάθε φιαλίδιο σύζευγμα ενζύμου.)
- ❑ Αραιώστε τα δείγματα, τα πρότυπα και τους μάρτυρες 1:10 με Assay Buffer (π.χ. 50 μl δείγμα + 450 μL Assay Buffer)

Διαδικασία Ανάλυσης



iu ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η MicroVue DPD είναι μία ουρολογική ανάλυση που προσφέρει ποσοτική μέτρηση της απέκκρισης των διασταυρώσεων δεοξυπυριδινολίνης (DPD) ως δείκτη της απορρόφησης οστού. Αυξημένα επίπεδα ουρικής DPD φανερώνουν αυξημένη απορρόφηση οστού. Η μέτρηση της DPD προορίζεται ως βοήθημα στην παρακολούθηση μεταβολών της απορρόφησης οστού σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, στις οποίες χορηγούνται ορμονικές αντιαπορροφητικές θεραπείες ή θεραπείες διφωσφονικών και σε άτομα, στα οποία έχει διαγνωστεί οστεοπόρωση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΞΗΓΗΣΗ

Περίπου 90% της οργανικής ουσίας των οστών είναι κολλαγόνο τύπου I, μια τριπλή ελικοειδής πρωτεΐνη.¹ Το κολλαγόνο τύπου I των οστών διασταυρώνεται με συγκεκριμένα μόρια που παρέχουν σταθερότητα και δύναμη. Οι διασταυρώσεις του ώριμου κολλαγόνου τύπου I στα οστά είναι οι διασταυρώσεις πυριδινίου, πυριδινολίνης (PYD) και δεοξυπυριδινολίνης (DPD).^{1,2} Η DPD σχηματίζεται από την ενζυματική δράση της λυσιλικής οξειδάσης στο αμινοξύ λυσίνη.³ Η DPD απελευθερώνεται στην κυκλοφορία κατά τη διαδικασία απορρόφησης οστού.^{2,5} Η DPD εκκρίνεται χωρίς να έχει μεταβολιστεί στα ούρα και δεν επηρεάζεται από τη διατροφή,⁶ κάτι που την κάνει κατάλληλη για τον υπολογισμό της απορρόφησης.

Τα οστά υποβάλλονται διαρκώς σε μεταβολική διαδικασία που ονομάζεται ανάπλαση.^{2,7} Αυτή συμπεριλαμβάνει την απορρόφηση, μία διαδικασία αποικοδόμησης του οστού, στην οποία μεσολαβεί η δράση των οστεοκλαστών, και την οστεογένεση, μία διαδικασία δόμησης του οστού, στην οποία μεσολαβεί η δράση των οστεοβλαστών.^{2,7} Η ανάπλαση απαιτείται για τη συντήρηση και τη γενικότερη υγεία του οστού ενώ οι δύο διαδικασίες είναι στενά συνδεδεμένες, δηλαδή η απορρόφηση και η οστεογένεση βρίσκονται σε ισορροπία.⁷ Σε μη φυσιολογικές καταστάσεις μεταβολισμού των οστών, η διαδικασία αυτή παύει να αποτελεί ζεύγος και όταν η απορρόφηση ξεπερνά την οστεογένεση το αποτέλεσμα είναι η καθαρή απώλεια οστού.⁷ Η μέτρηση ειδικών προϊόντων εκφυλισμού της ουσίας των οστών παρέχει αναλυτικά δεδομένα σχετικά με το ρυθμό του μεταβολισμού των οστών.^{2,4,5}

Η οστεοπόρωση είναι μία νόσος του μεταβολισμού των οστών, που χαρακτηρίζεται από παθολογική ανάπλαση. Είναι μία νόσος του περιφερικού σκελετού, που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική μάζα και αποσύνθεση της μικροαρχιτεκτονικής του οστικού ιστού, η οποία έχει ως συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας σε κατάγματα.⁸ Ο πιο κοινός τύπος οστεοπόρωσης εμφανίζεται σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση ως αποτέλεσμα της ανεπάρκειας οιστρογόνων λόγω της παύσης λειτουργίας των ωοθηκών.⁷ Η επιστροφή στα επίπεδα οιστρογόνων προ της εμμηνόπαυσης με θεραπεία αντικατάστασης παρεμποδίζει την απώλεια οστού και την οστεοπόρωση.⁷⁻¹⁰ Τα οιστρογόνα και μία κατηγορία σκευασμάτων γνωστά ως διφωσφονικά είναι αντιαπορροφητικές θεραπείες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παρεμποδίσουν την απώλεια οστού ή για να θεραπεύσουν την οστεοπόρωση.⁷⁻¹² Η οστεοπόρωση μπορεί επίσης να προκληθεί από την αδυναμία απόκτησης επαρκούς μέγιστης οστικής μάζας κατά τα χρόνια της ανάπτυξης, από μια ηλικιακά σχετιζόμενη διαταραχή της οστικής ανάπλασης, στην οποία παρατηρείται υπερβολική οστική απορρόφηση, και από μία σειρά κλινικών καταστάσεων και θεραπειών, οι οποίες

προκαλούν απώλεια οστού ή διαταραχές στην ανάπτυξη οστού.⁷ Αυτές συμπεριλαμβάνουν ασθένειες του ενδοκρινικού συστήματος, όπως υπογοναδισμό, υπερθυροειδισμό, υπερπαραθυροειδισμό, νεφρική ανεπάρκεια, γαστρεντερικές παθήσεις που σχετίζονται με τη διατροφή και το μεταβολισμό των ανόργανων αλάτων, ασθένειες του συνδετικού ιστού, πολλαπλά μυελώματα, χρόνια ακινησία, αλκοολισμό ή χρήση καπνού και χρόνια θεραπεία με ηπαρίνη ή κορτικοστεροειδή.⁷ Άλλες ασθένειες που χαρακτηρίζονται από παθολογική ανάπτυξη οστού περιλαμβάνουν τη νόσο του Paget και καρκίνους με μεταστάσεις στα οστά.³

Για την ανάλυση MicroVue DPD, χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία αντισωμάτων για την παραγωγή ενός μονοκλωνικού αντισώματος που παρουσιάζει ειδικότητα για τη DPD.¹³ Η ειδικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος που χρησιμοποιείται στην ανάλυση MicroVue DPD επιτρέπει την απλή, εύκολη, άμεση και επαναλήψιμη ποσοτική εκτίμηση της DPD στα ούρα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση MicroVue DPD είναι ανταγωνιστικός ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός σε μορφή ταινίας μικροτίτλου, που χρησιμοποιεί ένα μονοκλωνικό anti-DPD αντίσωμα το οποίο βρίσκεται επιχρισμένο στην ταινία για τη σύλληψη της DPD. Η DPD του δείγματος ανταγωνίζεται τη συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση DPD για το αντίσωμα και η αντίδραση εντοπίζεται με ένα υπόστρωμα pNPP. Τα αποτελέσματα της MicroVue DPD διορθώνονται για ουρική συγκέντρωση μέσω κρεατινίνης.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

96 αναλύσεις για διασταυρώσεις δεοξυπυρινιδολίνης

Το κιτ της MicroVue DPD EIA περιέχει τα παρακάτω:

- A**
B DPD Standards A – F (DPD πρότυπα A – F)
C Μέρη 4203 έως 4208 0,3 mL το καθένα
D (A=0, B=3, C=10, D=30, E=100, F=300 nmol/L DPD)
E DPD απομονωμένη από βόεια οστά σε 10mmol/L φωσφορικού
F οξέος που περιέχει αζίδιο του νατρίου (0,05%) ως συντηρητικό
- L** Low/High Control (μάρτυρες Low/High)
H Μέρη 4209, 4210 0,3 mL το καθένα
 DPD απομονωμένη από βόεια οστά σε 10mmol/L φωσφορικού οξέος που περιέχει αζίδιο του νατρίου (0,05%) ως συντηρητικό
- 1** Coated Strips Μέρος 4661 12 τεμάχια
 (Επιχρισμένες ταινίες)
 Απομονωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα Anti-DPD ποντικού προσροφημένο στις ταινίες
- 2** Stop Solution Μέρος 4702 15 mL
 NaOH 0,5N
- 3** 10X Wash Buffer Μέρος 4703 55 mL
 (ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης)
 Μη ιοντικό απορρυπαντικό σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει αζίδιο του νατρίου (0,05%) ως συντηρητικό
- 4** Assay Buffer Μέρος 4704 55 mL
 (ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης)
 Μη ιοντικό απορρυπαντικό σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει αζίδιο του νατρίου (0,05%) ως συντηρητικό

- 5** Substrate Buffer Μέρος 4705 3 x 10 mL
 (ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος)
 Διάλυμα διαιθανολαμίνης και χλωριούχου μαγνησίου που περιέχει αζίδιο του νατρίου (0,05%) ως συντηρητικό
- 6** Substrate Tablets Μέρος 0012 3 x 20 mg
 (Δισκία υποστρώματος)
 p-φωσφορικό νιτροφαινύλιο
- 7** Σύζευγμα ενζύμου Μέρος 4202 3 το καθένα
 Λυοφιλοποιημένη DPD, απομονωμένη από βόεια οστά, συζευγμένη με αλκαλική φωσφατάση, που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων και σταθεροποιητές
- Κάλυμμα Ταινίας Πλάκας**
Μέρος 0047 3 το καθένα

ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Μικροπιπέττες για χορήγηση 50–300 μL
- Αντικείμενα κατάλληλα για μέτρηση υγρών όγκου 7-300 mL
- Δοχείο για αραίωση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης
- Σωλήνες για την αραίωση των δειγμάτων, των προτύπων και των μαρτύρων
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Συσκευή για ανάγνωση οπτικής πυκνότητας πλακών στα 405 nm
- Λογισμικό με ικανότητα χάραξης καμπύλη βαθμονόμησης 4 παραμέτρων
- Τιμές κρεατινίνης (mmol/L) για δείγματα ούρων

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Για διαγνωστική χρήση *In Vitro*.
2. Αντιμετωπίστε τα αντιπροσωπευτικά δείγματα ως ενδεχομένως βιολογικά επικίνδυνα υλικά. Ακολουθήστε τις Γενικές Προφυλάξεις, όταν χειρίζεστε περιεχόμενα αυτού του κιτ και δείγματα ασθενών.
3. Απαλλαχθείτε από τα δοχεία και τα μη χρησιμοποιημένα περιεχόμενα σύμφωνα με τις ομοσπονδιακές, κρατικές και τοπικές ρυθμιστικές απαιτήσεις.
4. Χρησιμοποιήστε τα παρεχόμενα αντιδραστήρια ως ολοκληρωμένη μονάδα πριν από την ημερομηνία λήξης, που αναγράφεται στην ετικέτα της συσκευασίας.
5. Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ιματισμό, γάντια και προστασία ματιών/προσώπου όταν χειρίζεστε περιεχόμενα αυτού του κιτ.
6. Φυλάξτε τα αντιδραστήρια ανάλυσης όπως ορίζεται.
7. Μη χρησιμοποιείτε τα Coated Strips, αν ο σάκος είναι διάτρητος.
8. Ελέγξτε κάθε δείγμα διπλά.
9. Το NaOH 0,5N θεωρείται διαβρωτικό και μπορεί να προκαλέσει σοβαρά εγκαύματα. Αποφύγετε την κατάποση. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα, τα μάτια ή τα ρούχα. Αν υπάρξει επαφή, πλύνετε με νερό. Αν ληφθεί από το στόμα, καλέστε γιατρό.

10. Το αζίδιο του νατρίου χρησιμοποιείται ως συντηρητικό. Η τυχαία επαφή ή κατάποση ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να προκαλέσει ερεθισμό στο δέρμα, στα μάτια ή στο στόμα. Χρησιμοποιείτε ρυθμιστικά διαλύματα για τους συγκεκριμένους μόνο σκοπούς και αποφύγετε την επαφή με οξέα. Το αζίδιο του νατρίου ενδεχομένως αντιδρά με υδραυλικές σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και πιθανόν να σχηματίσει ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη ξεπλύνετε με άφθονο νερό για να παρεμποδιστεί η δημιουργία αζιδίων.
11. Το ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος περιέχει διαιθανολαμίνη και ενδέχεται να προκαλεί ερεθισμό στα μάτια ή/και στο δέρμα μετά από παρατεταμένη επαφή. Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ιματισμό, γάντια και προστασία ματιών/προσώπου. Οι περιοχές που έχουν προσβληθεί πρέπει να πλένονται αμέσως με σαπούνι και νερό.
12. Τα πρότυπα και οι μάρτυρες βρίσκονται σε 10 mmol/L φωσφορικού οξέος. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα, τα μάτια ή τα ρούχα. Απαγορεύεται η κατάποση. Αν υπάρξει επαφή, πλύνετε με νερό. Αν ληφθεί από το στόμα, καλέστε γιατρό.
13. Συνιστάται η χρήση πολυκαναλικών ή επαναληπτικών πιπετών για την εξασφάλιση της έγκαιρης χορήγησης των αντιδραστηρίων.
14. Για την ακριβή μέτρηση δειγμάτων προσθέστε με ακρίβεια δείγματα και πρότυπα. Λάβετε με πιπέττα χρησιμοποιώντας μόνο βαθμονομημένα όργανα.
15. Αραιώστε δείγματα με συγκέντρωση μεγαλύτερη από 300 nmol/L σε Assay Buffer και επαναλάβετε τον έλεγχο. Συμπεριλάβετε το συντελεστή αραιώσης στον τελικό υπολογισμό.
16. Η ανάλυση αυτή μπορεί να γίνει με οποιαδήποτε αξιόπιστη μέθοδο πλύσης.
17. Τα πρότυπα δεοξυπυριδολίνης, οι μάρτυρες και τα συνδεδεμένα ένζυμα έχουν ευαισθησία στο φως. Αποφύγετε την παρατεταμένη έκθεση στο φως, ιδιαίτερα άμεσα ή έμμεσα στο φως του ήλιου. Αποθηκεύστε τα αντιδραστήρια στο σκοτάδι, όταν δε χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα και τα αντιδραστήρια δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από το συνηθισμένο, τεχνητό φως του εργαστηρίου, όταν γίνεται χειρισμός τους όπως ορίζεται στη ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.
18. Αν η θερμοκρασία δωματίου δεν μπορεί να διατηρηθεί μεταξύ 20–28°C και η οπτική απορρόφηση >2,0 δεν είναι συμβατή με τη συσκευή ανάγνωσης της αντικειμενοφόρου σας, παρακολουθήστε την εξέλιξη του υποστρώματος στα πηγαδάκια Τύπου Α. Σταματήστε την αντίδραση, όταν η οπτική πυκνότητα φτάσει το 1,2–1,5. Στη συνέχεια, διαβάστε τις ταινίες.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Wash Buffer - Βλ. σημείωση διαδικασίας στην ενότητα ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Παρασκευάστε την απαιτούμενη ποσότητα Wash Buffer 1X (βλ. πίνακα στην ενότητα ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ) αραιώνοντας πυκνό Wash Buffer 10X με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10. Φυλάξτε στους 20–28°C. Χρησιμοποιήστε το Wash Buffer 1X μέσα σε 24 ώρες από την παρασκευή.

Ειδικές Οδηγίες Πλύσης: Παρασκευάστε το Wash Buffer 1X όπως παραπάνω και αποθηκεύστε στους 2–8°C μέχρι να το χρησιμοποιήσετε.

Σύζευγμα ενζύμου

Παρασκευάστε σύζευγμα ενζύμου μέσα σε 2 ώρες από τη χρήση. Επαναφέρετε κάθε απαιτούμενο φιαλίδιο συζεύγματος ενζύμου (βλ. Πίνακα) στην αρχική του μορφή με 7 mL Assay Buffer. Αποθηκεύστε το σύζευγμα ενζύμου στους 2–8°C μέχρι τη χρήση.

Working Substrate Solution (Διάλυμα υποστρώματος εργασίας)

Φέρτε το Substrate Buffer σε θερμοκρασία 20–28°C προτού ξεκινήσετε την ανάλυση. (Συνιστώνται δυο ώρες έως και μια νύχτα.) Παρασκευάστε το Working Substrate Solution μία ώρα πριν τη χρήση. Τοποθετήστε ένα δισκίο υποστρώματος σε κάθε απαιτούμενη φιάλη Substrate Buffer (βλ. πίνακα). Αφήστε 30–60 λεπτά για να διαλυθεί το δισκίο (ή τα δισκία). Ανακινήστε τη(τις) φιάλη(ες) έντονα για να αναμειχθεί καλά το περιεχόμενο.

ΦΥΛΑΞΗ

Φυλάξτε το κιτ στους 2–8°C.

Μην καταψύχετε.

Φυλάξτε τα μη χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια στους 2–8°C.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η ανάλυση MicroVue DPD μπορεί να διεξαχθεί με τη χρήση των πρώτων πρωινών ούρων χωρίς συντηρητικά ή δεύτερων πρωινών ούρων. Συνιστάται οι συλλογές να γίνονται πριν τις 10.00 π.μ. για να αποφεύγεται οποιαδήποτε πιθανή επιρροή ημερήσιας διακύμανσης. Το δείγμα ούρων μπορεί να διατηρηθεί σε ψυγείο (2–8°C) για όχι περισσότερο από 7 ημέρες ή κατεψυγμένο σε $\leq -20^\circ\text{C}$ για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Μην υποβάλλετε τα δείγματα σε περισσότερους από 5 κύκλους ψύξης/τήξης. Αποφύγετε την παρατεταμένη έκθεση στο φως, ιδιαίτερα στο ηλιακό. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ρουτίνας, τα δείγματα δεν επηρεάζονται από το συνηθισμένο, τεχνητό εργαστηριακό φωτισμό.

Όταν παρακολουθείτε τη θεραπεία, συλλέξτε δείγματα ποσότητας αναφοράς πριν την έναρξη της θεραπείας. Για επόμενες συγκρίσεις, συλλέξτε δείγματα την ίδια ώρα της ημέρας όπως και τα δείγματα της γραμμής αναφοράς.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Πριν ξεκινήσετε την ανάλυση διαβάστε ολόκληρο το ένθετο του προϊόντος.

Βλ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ πριν προχωρήσετε.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ: Η ανάλυση MicroVue DPD παρουσιάζει ευαισθησία στις συνθήκες πλύσης. **Ολόκληρο το βήμα πλύσης πρέπει να ολοκληρωθεί σε 2 λεπτά. Αν το βήμα πλύσης ΔΕΝ ΜΠΟΡΕΙ να ολοκληρωθεί μέσα σε δύο λεπτά, ακολουθήστε τις Ειδικές Οδηγίες Πλύσης που βρίσκονται στις ενότητες ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ και Βήμα Πλύσης.**

Καθορίστε την ποσότητα κάθε αντιδραστηρίου που απαιτείται για τον αριθμό ταινιών που θα χρησιμοποιηθούν.

Αριθμός ταινιών	4	6	8	12
Αριθμός δειγμάτων (θα ελεγχθούν εις διπλούν)	8	16	24	40
Σύζευγμα ενζύμου (φιαλίδιο)	1	1	2*	2*
Υπόστρωμα (φιάλη)	1	1	2*	2*
Wash Buffer 1X (mL)	100	150	200	300

* Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί πάνω από μία φιάλη ή φιαλίδιο, συνδυάστε τα περιεχόμενα και αναμίξτε πριν τη χρήση.

Επώαση δείγματος/συζεύγματος ενζύμου

1. Αραιώστε τα δείγματα, τα πρότυπα και τους μάρτυρες 1:10 με Assay Buffer (π.χ. 50 μL δείγμα + 450 μL Assay Buffer).
2. Αφαιρέστε το Stripwell Frame και τον απαιτούμενο αριθμό Coated Strips από το σάκο (βλ. πίνακα). Βεβαιωθείτε ότι ο σάκος που περιέχει όλες τις μη χρησιμοποιημένες ταινίες σφραγίστηκε ξανά.
3. Τοποθετήστε τον επιθυμητό αριθμό Coated Strips στο Stripwell Frame (Πλαίσιο ταινιών). Σημειώστε τις ταινίες με ετικέτα για να αποφύγετε τη σύγχυση σε περίπτωση απομάκρυνσης από το πλαίσιο.
4. Προσθέστε 50 μL αραιωμένο πρότυπο, μάρτυρα ή δείγμα σε κάθε πηγαδάκι των Coated Strips. Το βήμα αυτό πρέπει να ολοκληρωθεί μέσα σε 30 λεπτά.
5. Παρασκευάστε σύζευγμα ενζύμου μέσα σε 2 ώρες από τη χρήση. Διαλυτοποιήστε το περιεχόμενο κάθε απαιτούμενου φιαλιδίου συζεύγματος συζεύγματος ενζύμου (βλ. Πίνακα) με 7 mL Assay Buffer. Αποθηκεύστε το σύζευγμα ενζύμου σε 2–8°C μέχρι τη χρήση.
6. Προσθέστε 100 μL συζεύγματος διαλυτοποιημένου συζεύγματος ενζύμου σε κάθε πηγαδάκι. Καλύψτε τις ταινίες με το κάλυμμα ταινίας που σας παρέχεται. Επώαση για 2 ώρες (± 5 λεπτά) στους 2–8°C. Η επώαση αυτή θα πρέπει να γίνει στο σκοτάδι.
7. Παρασκευάστε το Working Substrate Solution μία ώρα πριν τη χρήση. Τοποθετήστε ένα δισκίο υποστρώματος σε κάθε απαιτούμενη φιάλη Substrate Buffer σε 20–28°C (βλ. πίνακα). Αφήστε 30–60 λεπτά για να διαλυθεί το δισκίο (ή τα δισκία). Ανακινήστε τη(τις) φιάλη(ες) έντονα για να αναμειχθεί καλά το περιεχόμενο.

Βήμα πλύσης

8. Παρασκευάστε την απαιτούμενη ποσότητα Wash Buffer 1X (βλ. πίνακα) αραιώνοντας Wash Buffer 10X με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10. Αντιστρέψτε/αδειάστε τις ταινίες χειροκίνητα. Προσθέστε τουλάχιστον 250 μL Wash Buffer 1X σε κάθε πηγαδάκι και αντιστρέψτε/αδειάστε τις ταινίες χειροκίνητα. Επαναλάβετε άλλες δύο φορές, δηλ. συνολικά τρεις πλύσεις. Μετά την τελευταία πλύση στεγνώστε τις ταινίες καλά σε χάρτινες πετσέτες. Ενώ οι ταινίες είναι αντεστραμμένες, σκουπίστε προσεκτικά το κάτω μέρος των ταινιών με μια χάρτινη πετσέτα χωρίς χνούδι για να βεβαιωθείτε ότι το κάτω μέρος των ταινιών είναι καθαρό.

Ειδικές Οδηγίες Πλύσης: Διεξάγετε το βήμα πλύσης όπως παραπάνω, χρησιμοποιώντας κρύο (2–8°C) Wash Buffer 1X. Μετά από την τελευταία πλύση, αφήστε τις ταινίες να στραγγίξουν για 5–10 λεπτά σε χάρτινες πετσέτες, προτού προσθέσετε υπόστρωμα.

Επώαση υποστρώματος

9. Προσθέστε 150 μL Working Substrate Solution σε κάθε πηγαδάκι.
10. Επώαση για 60 λεπτά (± 5 λεπτά) στους 20–28°C.

Παύση/ανάγνωση

11. Προσθέστε 100 μL Stop Solution σε κάθε πηγαδάκι. Προσθέστε το Stop Solution με τον ίδιο τρόπο και στα ίδια χρονικά διαστήματα που προσθέσατε το Substrate Solution.
12. Διαβάστε την οπτική πυκνότητα στα 405 nm. Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν μεγάλες φυσαλίδες και ότι το κάτω μέρος των ταινιών είναι καθαρό. Οι ταινίες πρέπει να διαβαστούν μέσα σε **15 λεπτά** από την προσθήκη του Stop Solution.
13. Το λογισμικό ποσοτικής εκτίμησης με εξίσωση καμπύλης βαθμονόμησης 4 παραμέτρων πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των αποτελεσμάτων ανάλυσης MicroVue DPD.
Εξίσωση: $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$
14. Καθορίστε τη συγκέντρωση των δειγμάτων και των μαρτύρων από την τυπική καμπύλη.
15. Οι τιμές των μαρτύρων πρέπει να είναι εντός του εύρους που ορίζεται από το πιστοποιητικό ανάλυσης που σας παρέχεται μαζί με το κιτ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Το πιστοποιητικό ανάλυσης που υπάρχει στο κιτ αφορά τη συγκεκριμένη παρτίδα και χρησιμοποιείται για να επιβεβαιωθεί ότι τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από το εργαστήριό σας είναι ίδια με αυτά που αποκτήθηκαν από την Quidel Corporation. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας παρέχονται και χρησιμοποιούνται μόνο ως κατευθυντήρια οδηγία. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από το εργαστήριό σας μπορεί να διαφέρουν.

Παρέχεται το εύρος ποιοτικού ελέγχου. Οι τιμές ελέγχου προορίζονται για να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα της καμπύλης και τα αποτελέσματα του δείγματος. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθιερώνει τις δικές του παραμέτρους για αποδεκτά όρια ανάλυσης. Αν οι τιμές ελέγχου ΔΕΝ κυμαίνονται εντός των ορίων αποδοχής του εργαστηρίου σας, τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρέπει να θεωρηθούν αμφισβητήσιμα και τα δείγματα πρέπει να επαναληφθούν.

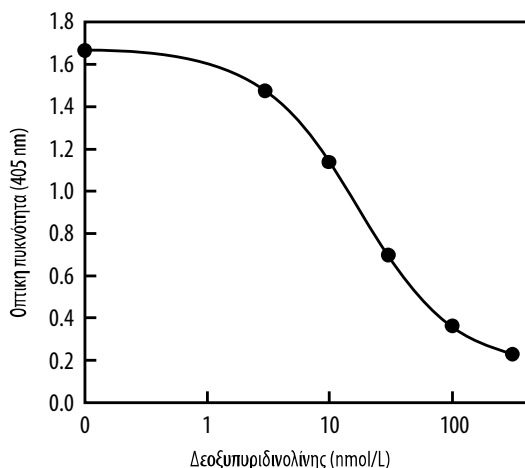
Αν η οπτική πυκνότητα του προτύπου A MicroVue DPD είναι μικρότερη από 0,8, τα αποτελέσματα πρέπει να θεωρηθούν αμφισβητήσιμα και, αν είναι δυνατόν, τα δείγματα πρέπει να επαναληφθούν.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση MicroVue DPD πρέπει να διορθωθούν για τις διακυμάνσεις στη συγκέντρωση ούρων διαιρώντας την τιμή DPD (nmol/L) με την τιμή της κρεατινίνης (nmol/L) του κάθε δείγματος (κρεατινίνη mg/dL x 0,088 = mmol/L). Τα τελικά αποτελέσματα MicroVue DPD εκφράζονται ως nmol DPD/mmol κρεατινίνης.

Αντιπροσωπευτική τυπική καμπύλη

Τυπικά επίπεδα DPD: 0, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/L



ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Παρόλον ότι η MicroVue DPD χρησιμοποιείται ως δείκτης της οστικής απορρόφησης, η χρήση της εξέτασης αυτής δεν έχει εδραιωθεί για την πρόβλεψη της ανάπτυξης οστεοπόρωσης ή του μελλοντικού κινδύνου καταγμάτων. Η χρήση της εξέτασης αυτής δεν έχει εδραιωθεί στον υπερπαραθυρεοειδισμό ή στον υπερθυρεοειδισμό. Αν χρησιμοποιείτε τη MicroVue DPD για την παρακολούθηση θεραπείας, τα αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν σύγχυση των αποτελεσμάτων σε πάσχοντες από κλινικές παθήσεις που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την απορρόφηση οστού, όπως π.χ. οι μεταστάσεις σε οστά και οι ασθένειες και παθήσεις που αναφέρονται παραπάνω. Τα αποτελέσματα της MicroVue DPD πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με κλινικά ευρήματα και με άλλα αποτελέσματα της διάγνωσης και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως μοναδικός καθοριστικός παράγοντας για την έναρξη ή αλλαγή θεραπείας.

ΤΙΜΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Οι τιμές αναφοράς του MicroVue DPD έχουν καθοριστεί για υγιείς άνδρες (n = 121) και υγιείς γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση (n = 312) πάνω από 25 ετών. Για λόγους καθορισμού τιμών αναφοράς τα φυσιολογικά άτομα ορίστηκαν ως:

- Τυπικώς υγιή, χωρίς παθήσεις των οστών, ενδοκρινικές ή χρόνιες παθήσεις
- Με ομαλό έμμηνιο κύκλο (σε γυναίκες)
- Όχι έγκυες ή θηλάζουσες (γυναίκες)
- Χωρίς να λαμβάνουν επί του παρόντος φάρμακα που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τον μεταβολισμό των οστών (π.χ. κορτικοστεροειδή, ανάλογα GnRH, αντισπασμωδικά, ηπαρίνη, φάρμακα για τον θυρεοειδή)

Οι τιμές μπορεί να επηρεάζονται από παράγοντες όπως η χαμηλή παραγωγή οιστρογόνων, η χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου, η χαμηλή σωματική δραστηριότητα ή οι ασθένειες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τον μεταβολισμό των οστών, όπως η οστεοπόρωση, η νόσος Paget, ο υπερπαραθυρεοειδισμός, ο υπερθυρεοειδισμός και η μετάσταση στα οστά. Η ανεπάρκεια οιστρογόνων σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη οστική απορρόφηση. Συνιστάται να χρησιμοποιηθούν οι τιμές αναφοράς για τις

γυναίκες πριν από την εμμηνόπαυση για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των γυναικών μετά την εμμηνόπαυση. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει τις δικές του φυσιολογικές τιμές αναφοράς. Το εύρος εκφράζεται ως μη παραμετρικά διαστήματα αναφοράς (διαστήματα εμπιστοσύνης 90%).

	Ηλικία (Έτη)	Μ.Ο.	Τυπική απόκλιση (nmol DPD/mmol Cr)	Εύρος
Females	25 - 44	5,0	1,4	3,0 - 7,4
Males	25 - 55	3,8	1,0	2,3 - 5,4

Η αναμενόμενη διακύμανση στο ίδιο άτομο καθορίστηκε από τα δείγματα ούρων 49 υγιών ατόμων, που συλλέγονταν επί πέντε μη συνεχόμενες μέρες κατά τη διάρκεια δύο εβδομάδων. Η μέση τιμή της ατομικής κατά μήκος διακύμανσης στο ίδιο άτομο ήταν 15,5%. Η διακύμανση μεταξύ ατόμων αντιπροσωπεύεται στα μη παραμετρικά διαστήματα αναφοράς που φαίνονται παραπάνω.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Ειδικότητα αντισωμάτων

	% Αντιδραστικότητα
Ελεύθερη DPD	100%
Ελεύθερη PYD	< 1%
Πεπτίδια PYD/DPD	
≥ 1000 MW	< 2,5%
≥ 3500 MW	< 2,5%

Ευαισθησία

Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της ανάλυσης MicroVue DPD είναι 1,1 nmol/L, το οποίο καθορίζεται από το ανώτατο όριο 3 SD σε μελέτη με μηδενικό πρότυπο.

Ανάκτηση – Ανάκτηση Spike

Η ανάκτηση spike καθορίστηκε προσθέτοντας μία γνωστή ποσότητα εξαγνισμένης DPD σε δείγματα ούρων με διαφορετικά επίπεδα ενδογενούς DPD. Τα τυπικά αποτελέσματα δίνονται παρακάτω.

Δείγμα	Ενδογενής (nmol/L)	Προστιθέμενη (nmol/L)	Παρατηρημένη (nmol/L)	Ανάκτηση (%)
1	3,1	27,3	32,0	106
2	11,2	27,3	38,8	101
3	18,2	27,3	44,9	98

Ανάκτηση - Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα καθορίζεται με διαδοχική αραιώση δειγμάτων και σύγκριση ανάμεσα στις παρατηρούμενες και αναμενόμενες τιμές. Τα τυπικά αποτελέσματα δίνονται παρακάτω.

Δείγμα	Συντελεστής αραιώσης	Παρατηρημένη (nmol/L)	Αναμενόμενη (nmol/L)	Ανάκτηση (%)
1	neat	65,5	-	-
	1:2	31,8	32,8	97
	1:4	15,4	16,4	94
2	neat	84,6	-	-
	1:2	39,3	42,3	93
	1:4	19,4	21,1	92
3	neat	132,6	-	-
	1:2	65,6	66,3	99
	1:4	30,2	33,2	91
	1:8	16,8	16,6	101

Ακρίβεια

Η ακρίβεια εντός του ίδιου κύκλου προσδιορίστηκε για ≥ 21 επαναλήψεις 3 δειγμάτων σε 2 πλάκες σε κάθε μία από 3 παρτίδες κιτ (συνολικά 6 πλάκες). Η ακρίβεια μεταξύ των κύκλων προσδιορίστηκε αναλύοντας 3 δείγματα σε 9 ξεχωριστές πλάκες σε κάθε μία από 3 παρτίδες κιτ (συνολικά 27 πλάκες). Τα παρακάτω δείγματα αναπαριστούν εύρος τιμών σε nmol/L. Για γυναίκα με κρεατινίνη 4,5 nmol/L, τα δείγματα 1 έως 3 αναπαριστούν τη χαμηλή κανονική, την υψηλή κανονική και την αυξημένη απορρόφηση (2,4 nmol/mmol, 6,7 nmol/mmol, και 38,8 nmol/mmol αντίστοιχα).

Δείγμα	DPD (nmol/L DPD)	Εντός του κύκλου ¹ CV%	Μεταξύ των κύκλων 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 κύκλοι

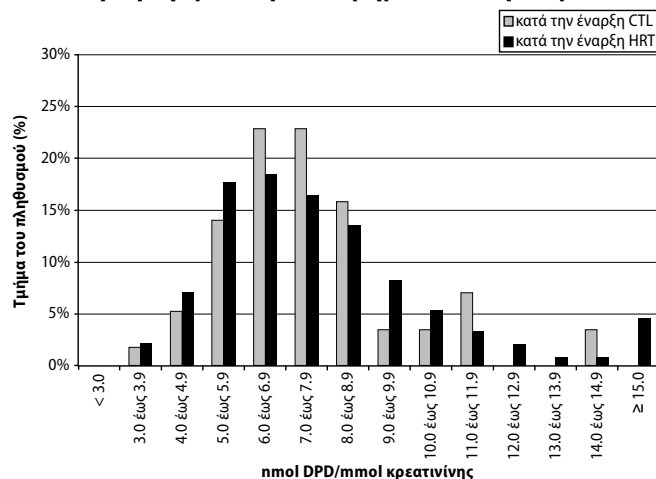
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Η χρήση της MicroVue DPD στην παρακολούθηση της ορμονικής αντιαπορροφητικής θεραπείας σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση

Μία πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη δοκιμή διεξάχθηκε με επιτυχία για να εδραιωθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της ανάλυσης MicroVue DPD στην παρακολούθηση μεταβολών της εκκρινόμενης στα ούρα DPD, που σχετίζεται με την αντιαπορροφητική θεραπεία οιστρογόνου/προγεστίνης. Η αυξημένη ανακύκλωση οστών και η σημαντική απώλεια οστού συχνά συσχετίζονται με τη μετεμμηνοπαυσική ανεπάρκεια οιστρογόνων. Η αντικατάσταση οιστρογόνων έχει καταδειχθεί αποτελεσματική στη μείωση της απορρόφησης οστών και στην προστασία της υπάρχουσας οστικής μάζας.⁷⁻¹⁰ Τα εξεταζόμενα άτομα ήταν γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση ηλικίας 45 έως 64 ετών (Μ.Ο. 56 ± 4 έτη), που έχουν υποστεί φυσική ή χειρουργική εμμηνόπαυση στο διάστημα των 10 τελευταίων ετών. Πριν την έναρξη της μελέτης, τα άτομα που πληρούσαν τις προϋποθέσεις, τυχαιοποιήθηκαν ως προς την ομάδα ενεργής θεραπείας (HRT): Premarin® (0,625 mg ημερησίως) με placebo προγεστίνης, Premarin (0,625 mg ημερησίως) και ενεργή προγεστίνη (Provera® 2,5 mg ανά ημέρα συνεχώς, Provera 10 mg ανά ημέρα κυκλικά ή προγεστερόνη σε σκόνη 200 mg ανά ημέρα κυκλικά) ή στην ομάδα ελέγχου (CTL): placebo οιστρογόνου και προγεστίνης. Τα πρώτα ή δεύτερα δείγματα πρωινών ούρων από όλα τα άτομα λήφθηκαν πριν την έναρξη της μελέτης και στους 12 μήνες. Τα αποτελέσματα MicroVue DPD διορθώθηκαν για την αποβολή κρεατινίνης και εκφράστηκαν σε nmol DPD/mmol κρεατινίνης.

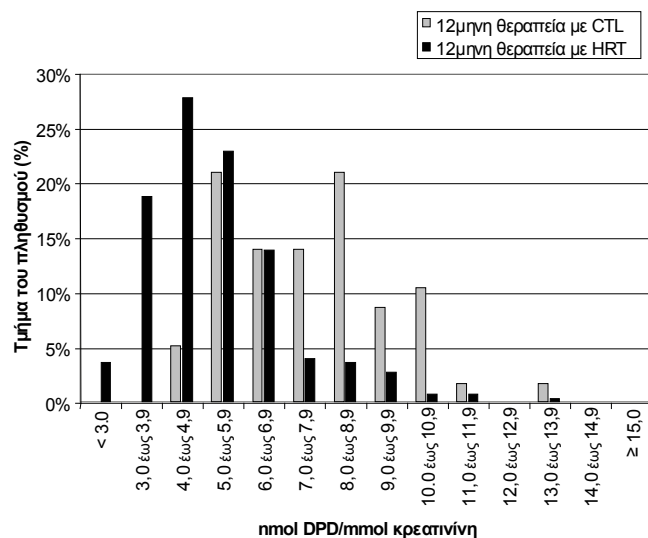
Η μέση ($\pm 1SD$) συγκέντρωση DPD κατά την έναρξη ($7,56 \pm 2,27$ έναντι $7,94 \pm 3,25$ nmol/mmol, $p = 0,304$) και της LSBMD ($0,97 \pm 0,17$ έναντι $0,97 \pm 0,15$ g/cm², $p = 0,792$) ήταν ίδιες για τις ομάδες CTL και HRT. Οι κατανομές των τιμών DPD της ποσότητας αναφοράς στις ομάδες HRT και CTL απεικονίζονται στην εικόνα 1 κατά τμήμα του πληθυσμού της μελέτης.

Εικόνα 1 Κατανομή των επιπέδων DPD κατά την έναρξη της μελέτης (ως τμήμα του πληθυσμού)



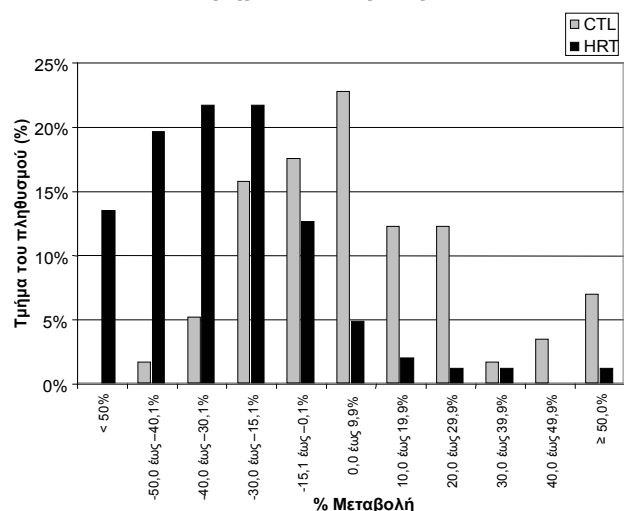
Η DPD ήταν σημαντικά χαμηλότερη για την ομάδα HRT παρά για τη CTL στους 12 μήνες ($5,27 \pm 1,78$ έναντι $8,08 \pm 3,63$ nmol/mmol, $p < 0,00001$). Στους 12 μήνες, τα άτομα της ομάδας HRT ήταν πιο πιθανό να εμφανίσουν συγκέντρωση DPD $\leq 7,4$ nmol/mmol από ό,τι τα άτομα της CTL (89% έναντι 51%, $p < 0,00001$), παρότι οι αναλογίες της ποσότητας αναφοράς ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες (CTL 56%, HRT 53%, $\leq 7,4$ nmol/mmol). Οι κατανομές των τιμών DPD μετά από 12 μήνες στις ομάδες HRT και CTL απεικονίζονται στην εικόνα 2.

Εικόνα 2 Κατανομή των επιπέδων DPD μετά από θεραπεία 12 μηνών με οιστρογόνο/προγεστίνη (HRT) ή placebo (CTL) (ως τμήμα του πληθυσμού)



Η μέση ($\pm 1SD$) συγκέντρωση DPD στα άτομα της ομάδας CTL αυξήθηκε ελαφρά από την έναρξη της μελέτης σε $+11,7\%$ ($\pm 49,7\%$) στους 12 μήνες ($p = 0,278$), ενώ οι συγκεντρώσεις DPD στα άτομα της HRT μειώθηκαν από την έναρξη της μελέτης σε $-29,1 \pm 23,8\%$ στους 12 μήνες ($p < 0,0001$). Οι κατανομές της μεταβολής των ποσοστών από την ποσότητα αναφοράς στις τιμές DPD μετά από 12 μήνες στις ομάδες HRT και CTL απεικονίζονται στην εικόνα 3.

Εικόνα 3 Κατανομή των επιπέδων μεταβολής των ποσοτών της DPD μετά από θεραπεία 12 μηνών με οιστρογόνο/προγεστίνη (HRT) ή placebo (CTL) (ως τμήμα του πληθυσμού)



Στους 12 μήνες τα άτομα της ομάδας HRT κέρδισαν LSBMD συγκριτικά με τα άτομα της CTL ($p < 0,00001$), όπως φαίνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Μεταβολές στη LSBMD (Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση)

	n	Ποσότητα (g/cm ²)	12 μήνες (g/cm ²)	Δ (%)
CTL	57	0,97 ± 0,17	0,95 ± 0,17	-1,6 ± 2,7
HRT	244	0,97 ± 0,15	1,01 ± 0,15	+3,7 ± 2,7

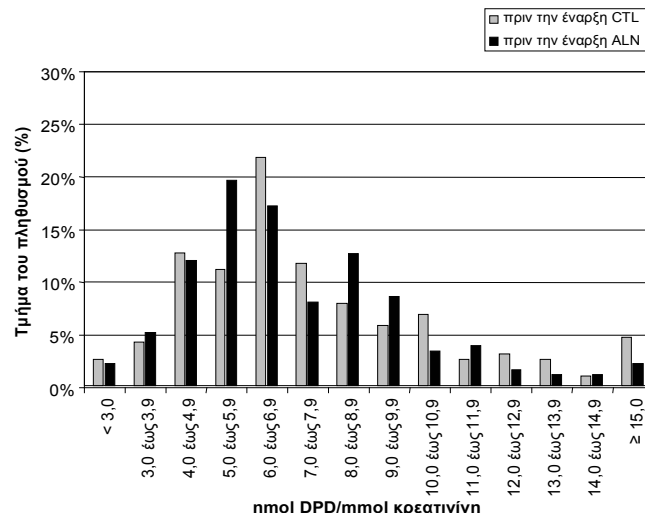
Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ανάλυση MicroVue DPD είναι ασφαλής και αποτελεσματική για την παρακολούθηση της αντιαπορροφητικής επίδρασης της θεραπείας αντικατάστασης ορμόνης σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση.

Η χρήση της MicroVue DPD στην παρακολούθηση της αντιαπορροφητικής θεραπείας διφωσφονικών στη θεραπεία της οστεοπόρωσης

Μία πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη διεξάχθηκε με επιτυχία για την εξασφάλιση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της ανάλυσης MicroVue DPD στην παρακολούθηση αλλαγών της ουρικής έκκρισης DPD, που σχετίζονται με την αντιαπορροφητική θεραπεία αμινο-φωσφονικών (αλενδρονικών). Τα εξεταζόμενα άτομα ήταν γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση ηλικίας 45 έως 84 ετών (Μ.Ο. 64 ± 7 έτη) με διαγνωσμένη οστεοπόρωση (βασισμένη στην κλινική εικόνα ή με πυκνότητα ανόργανων αλάτων του οσφυϊκού οστού [LSBMD] κατά την έναρξη της μελέτης χαμηλότερη από 2,5 τυπικές αποκλίσεις σε σχέση με το μέσο όρο των ώριμων γυναικών πριν την εμμηνόπαυση). Πριν την έναρξη, τα άτομα που πληρούσαν τις προϋποθέσεις, επιλέχθηκαν τυχαία για τη λήψη είτε 10 mg αλενδρονικών και 500 mg ασβεστίου ημερησίως (ALN) είτε για τη λήψη 500 mg ασβεστίου ημερησίως (CTL). Δείγματα δευτέρων πρωινών ούρων συλλέχθηκαν από όλα τα άτομα πριν την έναρξη της μελέτης, στους 3, 6 και 12 μήνες. Τα αποτελέσματα MicroVue DPD διορθώθηκαν για την αποβολή κρεατινίνης και εκφράστηκαν σε nmol DPD/nmol κρεατινίνη.

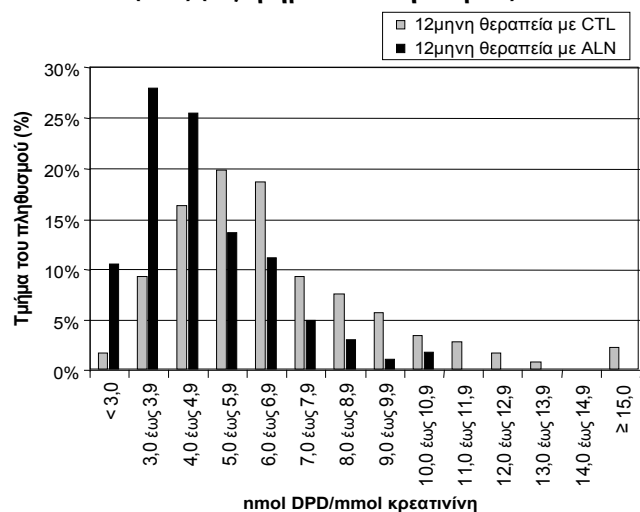
Η μέση (± 1SD) συγκέντρωση DPD της ποσότητας αναφοράς (7,35 ± 3,30 έναντι 7,74 ± 3,47 nmol/nmol, $p = 0,278$), και της LSBMD (0,75 ± 0,09 έναντι 0,74 ± 0,10 g/cm², $p = 0,426$) ήταν παρόμοιες για τις ομάδες ALN και CTL. Οι κατανομές των τιμών DPD της ποσότητας αναφοράς στις ομάδες ALN και CTL απεικονίζονται στην εικόνα 4 κατά τμήμα του πληθυσμού της μελέτης.

Εικόνα 4 Κατανομή επιπέδων DPD στην ποσότητα αναφοράς (αναλογικά με τον πληθυσμό)



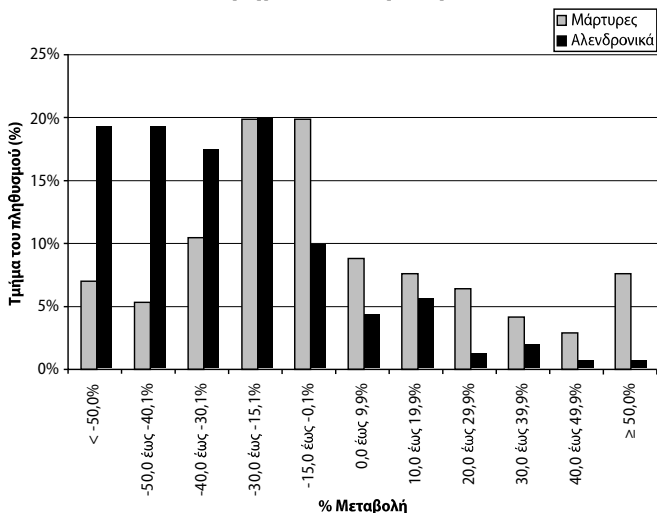
Η DPD ήταν σημαντικά χαμηλότερη για την ομάδα ALN παρά για την CTL στους 3 (5,45 ± 2,61 έναντι 7,56 ± 3,08 nmol/nmol, $p < 0,00001$), 6 (4,83 ± 1,94 έναντι 7,09 ± 3,33 nmol/nmol, $p < 0,00001$) και 12 μήνες (4,78 ± 1,75 έναντι 6,73 ± 2,98 nmol/nmol, $p < 0,00001$). Στους 3, 6 και 12 μήνες 84, 89 και 91% των ατόμων της ALN είχαν συγκέντρωση DPD ≤ 7,4 nmol/nmol. Τα άτομα της ομάδας ALN ήταν πιο πιθανό να εμφανίσουν συγκέντρωση DPD ≤ 7,4 nmol/nmol σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή ($p = 0,002$) παρά τα άτομα της CTL, παρότι οι αναλογίες της ποσότητας αναφοράς ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες (CTL 60,4%, ALN 57,8%, ≤ 7,4 nmol/nmol αντίστοιχα). Οι κατανομές των τιμών DPD μετά από 12 μήνες στις ομάδες ALN και CTL απεικονίζονται στην εικόνα 5.

Εικόνα 5 Κατανομή των επιπέδων της DPD μετά από θεραπεία 12 μηνών με αλενδρονικά (ALN) ή ασβέστιο (CTL) (ως τμήμα του πληθυσμού)



Η μέση (± 1 SD) συγκέντρωση DPD για τα άτομα της ομάδας CTL μειώθηκε σταδιακά από την τιμή κατά την έναρξη της μελέτης σε $-4,9\%$ ($\pm 34,9\%$) στους 12 μήνες ($p = 0,003$), κάτι που μπορεί να επηρεάσει την επίδραση διαφύλαξης οστού, που είναι χαρακτηριστική για το ασβέστιο.¹⁵ Η μέση συγκέντρωση DPD στα άτομα της ομάδας ALN μειώθηκε $22,9 \pm 37,4\%$ στους 3 μήνες, $28,6 \pm 25,8\%$ στους 6 μήνες και $29,5 \pm 26,7\%$ στους 12 μήνες. Οι κατανομές της μεταβολής των ποσοστών από την έναρξη της μελέτης στις τιμές DPD μετά από 12 μήνες στις ομάδες ALN και CTL απεικονίζονται στην εικόνα 6.

Εικόνα 6 Κατανομή των επιπέδων της μεταβολής ποσοστών της DPD μετά από θεραπεία 12 μηνών με αλενδρονικά (ALN) ή ασβέστιο (CTL) (ως τμήμα του πληθυσμού)



Στους 12 μήνες τα άτομα της ομάδας ALN κέρδισαν LSBMD συγκριτικά με τα άτομα της CTL ($p < 0,00001$), όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Μεταβολές στη LSBMD (Μέσος όρος \pm Τυπική απόκλιση)

	n	Ποσότητα αναφοράς (g/cm ²)	12 μήνες (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

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ανάλυση MicroVue DPD είναι ασφαλής και αποτελεσματική για την παρακολούθηση της αντιαπορροφητικής επίδρασης της θεραπείας αμινο-διφωσφινικών (αλενδρονικών) στα άτομα με διάγνωση οστεοπόρωσης.

Πρόσθετες μελέτες

Διεξάχθηκαν κλινικές μελέτες για την εκτίμηση των επιπέδων ουρικής δεοξυπυριδινολίνης, που λήφθηκαν με την ανάλυση MicroVue DPD σε σχέση με τα επίπεδα, που αποκτήθηκαν από την ανάλυση HPLC¹⁴ και την κλινική διάγνωση.

Η πρώτη έρευνα πραγματοποιήθηκε σε περιβάλλοντα κλινικών ερευνών με τη χρήση 54 δειγμάτων από υγιείς εθελοντές και 140 δειγμάτων από ασθενείς που έπασχαν από γνωστές παθήσεις των οστών (ανάμεσα στις οποίες οστεοπόρωση, νόσος του Paget, υπερπαραθυρεοειδισμός και υπερθυρεοειδισμός). Οι παθήσεις αυτές συχνά χαρακτηρίζονται από αυξημένη απορρόφηση οστών και η συγκεκριμένη ομάδα ατόμων θεωρήθηκε πληθυσμός που κινδυνεύει. Ωστόσο, δεν θεωρήθηκε αυτονόητο ότι όλα τα άτομα θα έχουν αυξημένη απορρόφηση οστών τη στιγμή της συλλογής δειγμάτων. Εκάτον τρεις από τους 140 ασθενείς στους οποίους διαγνώθηκε πάθηση των οστών δεν είχαν αυξημένες τιμές πυριδινολίνης, όταν μετρήθηκαν με την HPLC. Οι τιμές δεοξυπυριδινολίνης της MicroVue DPD στα υγιή άτομα ποίκιλε από 2,3 έως 11,2 nmol/mmol και στους ασθενείς από 1,2 έως 37,3 nmol/mmol.

Στη μελέτη η ανάλυση MicroVue DPD συγκρίθηκε με μία ερευνητική μέθοδο HPLC¹⁴ για τη μέτρηση της πυριδινολίνης. Ο ουδός HPLC σε μία μελέτη που έγινε με 84 υγιή άτομα καθορίστηκε στα 50 nmol/mmol για τους άντρες και στα 60 nmol/mmol για τις γυναίκες (95% το ανώτατο όριο διαστήματος εμπιστοσύνης για κάθε φύλο). Η χρήση αυξημένης πυριδινολίνης καθορίστηκε από την HPLC ως μέθοδος κατηγοριοποίησης και η τεχνική λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της ιδανικής σχετικής ευαισθησίας και ειδικότητας στον πληθυσμό που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Ένας πίνακας που εμφανίζει τον αριθμό των συμμετεχόντων σε κάθε κατηγορία παρουσιάζεται στην Εικόνα 7.

Πίνακας 3

MicroVue DPD	
Σχετική Ευαισθησία	69 %
Εξειδίκευση	87 %

Εικόνα 7

	HPLC Αυξημένη	Πυριδινολίνη Μη αυξημένη
MicroVue DPD +	31	20
MicroVue DPD -	14	129

Σε μια δεύτερη μελέτη, τα αποτελέσματα της ανάλυσης MicroVue DPD συγκρίθηκαν με μεικτό πληθυσμό 39 δειγμάτων από υγιή άτομα και 69 δειγμάτων από ασθενείς με την νόσο του Paget. Αν και η νόσος του Paget αντιπροσωπεύει ένα μοντέλο για την αναγνώριση της ενεργής απορρόφησης οστού, κάποιιοι από τους ασθενείς στην έρευνα αυτή λάμβαναν θεραπεία ή παρουσίαζαν ύφεση και ενδέχεται να μην είχαν αυξημένη απορρόφηση τη στιγμή της συλλογής των δειγμάτων. Στην έρευνα αυτή, τα υγιή άτομα κυμαίνονταν μεταξύ 2,3 και 6,4 nmol/mmol. Οι ασθενείς με νόσο του Paget κυμαίνονταν μεταξύ 1,7 και 50,4 nmol/mmol.

Χρησιμοποιώντας τη διάγνωση της ασθένειας του Paget ως μέθοδο κατηγοριοποίησης, η τεχνική ROC καθόριζε την ιδανική σχετική ευαισθησία και ειδικότητα στον πληθυσμό αυτό. Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Ένας πίνακας 2x2 παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.

Πίνακας 4

MicroVue DPD	
Σχετική Ευαισθησία	91 %
Εξειδίκευση	97 %

Εικόνα 8

Διάγνωση Paget
Ναι Όχι

MicroVue DPD	+	63	1
	-	6	38

ASSISTANCE

Για υπηρεσίες εκτός των ΗΠΑ παρακαλώ επικοινωνήστε με τον τοπικό διανομέα. Πρόσθετες πληροφορίες για την Quidel, τα προϊόντα μας και τους αντιπροσώπους μας μπορούν να βρεθούν στον ιστοχώρο μας www.quidel.com.

Καλύπτεται από τις Ευρεσιτεχνίες ΗΠΑ Αρ. 5,620,861, 5,700, 694, 6,121, 002, 5,283,197.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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.

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ



Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης στο CDROM



Προοριζόμενη χρήση

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