

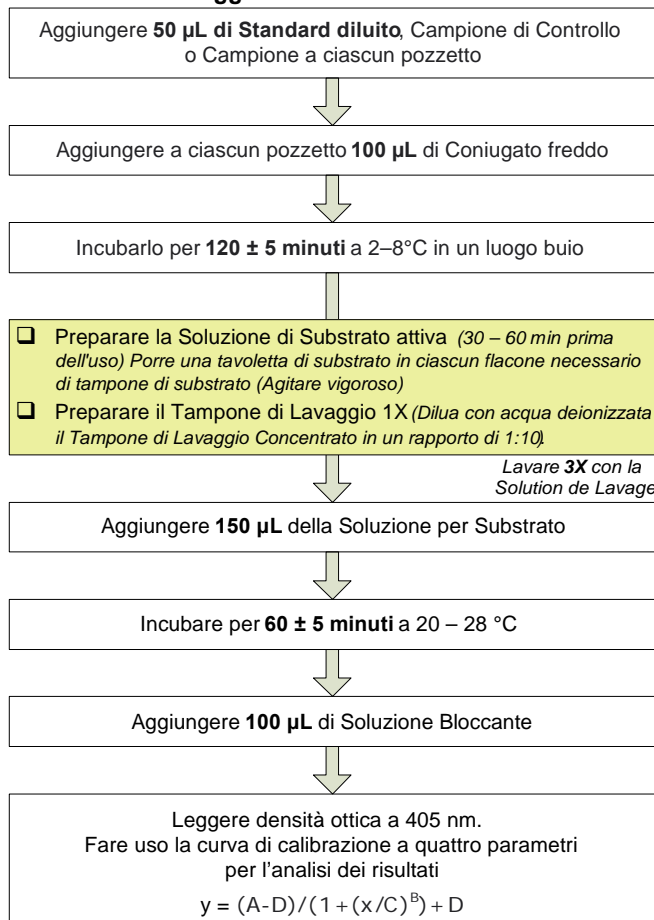
Saggio immunoenzimatico per la quantizzazione dei legami crociati di desossipiridinolina (DPD) nell'urina umana

### MicroVue™ DPD EIA Sommario

#### Preparato di il Campione ed il reagente

- Preparare il Coniugato Enzimatico con Tampone del Saggio; conservare a 2–8 °C. (7 ml Tampone del Saggio freddo per ciascuna fiala di Coniugato.)
- Diluire i Campioni, gli Standard e i Campioni di Controllo in un rapporto di 1:10 con il Tampone del Saggio (50 µL Campioni + 450 µL Tampone del Saggio)

#### Procedura del Saggio



#### FINALITÀ D'USO

MicroVue DPD è un saggio urinario che fornisce una misura quantitativa dell'escrezione dei legami crociati di desossipiridinolina (DeoxyPyriDinoline, DPD) come indicatore di riassorbimento dell'osso. Livelli elevati di DPD urinaria indicano un elevato riassorbimento dell'osso negli individui. La misura di DPD è prevista per l'uso come ausilio nel monitoraggio dei cambiamenti di riassorbimento dell'osso in donne in postmenopausa che fanno uso di terapie anti-riassorbenti con ormoni o bisfosfonato e in individui affetti da osteoporosi.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Circa il 90% della matrice organica ossea è formata da collagene di tipo I, una proteina a elica tripla.<sup>1</sup> Il collagene di tipo I delle ossa è crosslegato con molecole specifiche che forniscono rigidità e forza. I legami crociati del collagene maturo di tipo I nelle ossa sono quelli del piridinio, della piridinolina (PYD) e desossipiridinolina (DPD).<sup>1,2</sup> La DPD è formata dall'azione enzimatica della lisil-ossidasi sull'aminoacido lisina.<sup>3</sup> La DPD viene secreta in circolo durante il processo di riassorbimento osseo.<sup>2,5</sup> La DPD non metabolizzata viene espulsa nell'urina e non è influenzata dalla dieta,<sup>6</sup> cosa che la rende idonea per la valutazione del riassorbimento.

L'osso è sottoposto costantemente a un processo metabolico denominato rimodellazione.<sup>2,7</sup> Tale processo comprende una fase di degradazione, riassorbimento dell'osso, mediato dall'azione degli osteoclasti, e una fase di generazione, formazione dell'osso, mediata dall'azione degli osteoblasti.<sup>2,7</sup> La rimodellazione è necessaria per il mantenimento, in generale per la salute dell'osso ed è strettamente abbinata; vale a dire che il riassorbimento e la formazione sono bilanciati.<sup>7</sup> In condizioni anormali del metabolismo dell'osso, questo processo non va di pari passo e quando il riassorbimento supera la formazione, si ha una perdita netta dell'osso.<sup>7</sup> La misurazione dei prodotti specifici della degradazione della matrice ossea fornisce i dati analitici del tasso di metabolismo osseo.<sup>2,4,5</sup>

L'osteoporosi è una malattia metabolica dell'osso caratterizzata da una rimodellazione anormale dell'osso. Si tratta di una malattia scheletrica sistemica, caratterizzata da minore massa ossea e deterioramento della microarchitettura del tessuto osseo, con un conseguente aumento della suscettibilità alle fratture.<sup>8</sup> Il tipo maggiormente comune di osteoporosi si verifica in donne in postmenopausa in seguito alla mancanza di estrogeni causata dalla cessazione della funzione ovarica.<sup>7</sup> Il ripristino dei livelli di estrogeno in premenopausa con una terapia sostitutiva impedisce la perdita ossea e l'osteoporosi.<sup>7-10</sup> Gli estrogeni e una classe di composti conosciuti come bisfosfonati rappresentano delle terapie anti-riassorbenti che possono essere usate per impedire la perdita ossea o per curare l'osteoporosi.<sup>7-12</sup> È possibile anche che l'osteoporosi provochi una massa ossea con picco inadeguato durante gli anni di crescita, uno squilibrio della rimodellazione dell'osso riferito all'età con un eccesso netto di riassorbimento e numerose condizioni cliniche e terapie che inducono la perdita ossea o gli squilibri della rimodellazione dell'osso.<sup>7</sup> Queste comprendono malattie endocrine quali ipogonadismo, ipertiroidismo, iperparatiroidismo, ipercortisonismo; malattie gastrointestinali riferite al metabolismo della nutrizione e minerale; malattie del tessuto connettivo; mieloma multiplo; immobilizzazione cronica, alcolismo o uso di tabacco e terapia cronica con eparina o corticosteroidi.<sup>7</sup>

Altre malattie caratterizzate dalla rimodellazione anomala dell'osso comprendono il morbo di Paget e tumori metastatici dell'osso.<sup>3</sup>

Per il saggio MicroVue DPD, è stata impiegata la tecnologia degli anticorpi allo scopo di produrre un anticorpo monoclonale che dimostri la specificità di DPD.<sup>13</sup> La specificità dell'anticorpo monoclonale usato nel saggio MicroVue DPD consente la quantificazione in modo semplice, comodo, riproducibile e diretto di DPD nell'urina.

## PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il saggio MicroVue DPD è un saggio immunoenzimatico competitivo, in formato Stripwell per la microtitolazione, che utilizza un anticorpo monoclonale anti-DPD rivestito sulla striscia al fine di catturare la DPD. La DPD nel campione compete con la fosfatasi coniugata DPD-alcalina dal momento in cui l'anticorpo e la reazione vengono rilevati con un substrato pNPP. Per quanto riguarda la concentrazione urinaria, i risultati di MicroVue DPD vengono corretti con la creatinina.

## REAGENTI E MATERIALI FORNITI

### 96 saggi per legami crociati di desossipiridinolina

**MicroVue DPD EIA kit contiene i seguenti materiali e reagenti:**

<b>A</b>		
<b>B</b>	<b>Standard DPD A – F Codici da 4203 a 4208</b>	<b>0,3 mL ciascuno</b>
<b>C</b>	<b>(A = 0, B = 3, C = 10, D = 30, E = 100, F = 300 nmol/L DPD)</b>	
<b>D</b>	DPD purificata da osso di bovino in 10 mmol/L di acido fosforico	
<b>E</b>	contenente azide di sodio (0,05%) come conservante	
<b>F</b>		
<b>L</b>	<b>Campioni di controllo inferiori/superiori</b>	
<b>H</b>	<b>Codici 4209, 4210</b>	<b>0,3 mL ciascuno</b>
	DPD purificata da osso di bovino in 10 mmol/L di acido fosforico	
	contenente azide di sodio (0,05%) come conservante	
<b>1</b>	<b>Strisce rivestite Codice 4661</b>	<b>12 pezzi</b>
	Anticorpo monoclonale Anti-DPD murino purificato assorbito in Stripwell	
<b>2</b>	<b>Soluzione bloccante Codice 4702</b>	<b>15 mL</b>
	0,5N NaOH	
<b>3</b>	<b>Tampone di lavaggio 10X Codice 4703</b>	<b>55 mL</b>
	Detergente non ionico in una soluzione tamponata contenente azide di sodio (0,05%) come conservante	
<b>4</b>	<b>Tampone saggio Codice 4704</b>	<b>55 mL</b>
	Detergente non ionico in una soluzione tamponata contenente azide di sodio (0,05%) come conservante	
<b>5</b>	<b>Tampone del substrato Codice 4705</b>	<b>3 x 10 mL</b>
	Soluzione di dietanolammina e cloruro di magnesio contenente azide di sodio (0,05%) come conservante	
<b>6</b>	<b>Tavolette di substrato Codice 0012</b>	<b>3 x 20 mg</b>
	Fosfato di p-Nitrofenile	
<b>7</b>	<b>Coniugato enzimatico Codice 4202</b>	<b>3 pezzi</b>
	DPD liofilizzata, purificata da ossa di bovino, coniugata con fosfatasi alcalina contenente sali del tampone e stabilizzatori	
	<b>Nastro copri piastra Codice 0047</b>	<b>3 pezzi</b>

## MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Micropipette per la fornitura di 50–300 µL
- Elementi adatti per la misurazione di liquidi da 7-300 mL
- Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio
- Provette per la diluizione di campioni, standard e campioni di controllo
- Acqua deionizzata o distillata
- Lettore per piastra in grado leggere a 405 nm
- Software per adattamento della curva di calibrazione a quattro parametri
- Valori della creatinina (mmol/L) per i campioni di urina

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *In Vitro*.
2. Trattare tutti i campioni come materiale a potenziale rischio biologico. Seguire le precauzioni generali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualunque campione paziente.
3. Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con i requisiti delle normative federali, statali e locali.
4. Usare i reagenti forniti come un'unità integrale prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
5. Indossare adeguati indumenti di protezione, guanti e protezioni per occhi/viso durante la manipolazione del contenuto di questo kit
6. Conservare i reagenti del saggio come indicato.
7. Non usare le strisce rivestite se la busta protettiva è danneggiata.
8. Sottoporre a test ciascun campione in duplicato.
9. 0,5N NaOH è considerato corrosivo e può causare gravi ustioni. Non ingerirlo. Evitare il contatto con la cute, gli occhi o gli indumenti. Se avviene il contatto, lavare con acqua. Se ingerito, consultare un medico.
10. L'azide di sodio viene usato come conservante. Il contatto o l'ingestione accidentale di tamponi contenenti azide di sodio può causare irritazioni alla cute, agli occhi o alla bocca. Usare esclusivamente i tamponi per gli scopi previsti ed evitare il contatto con gli acidi. È possibile che l'azide di sodio reagisca con tubazioni in rame e in piombo e formi azidi metallici altamente esplosivi. Dopo lo smaltimento, lavare con una grande quantità di acqua per impedire l'accumulo di azide.
11. Il tampone del substrato contiene dietanolamina e, in caso di contatto prolungato, può provocare irritazione agli occhi e/o alla cute. Indossare adeguati indumenti di protezione, guanti e protezioni per occhi/viso. Occorre lavare immediatamente con sapone e acqua le aree entrate in contatto.
12. Gli standard e i campioni di controllo si trovano in acido fosforico a 10 mmol/L. Evitare il contatto con la cute, gli occhi o gli indumenti. Non ingerirlo. Se avviene il contatto, lavare con acqua. Se ingerito, consultare un medico.
13. Si consiglia l'uso di pipette multicanale o di pipettatori a ripetizione per garantire la fornitura veloce dei reagenti.

14. Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere accuratamente i campioni e gli standard. Pipettare attentamente, usando esclusivamente apparecchiature calibrate.
15. Diluire i campioni maggiori di 300 nmol/L nel tampone del saggio ed effettuare di nuovo il test. Comprendere il fattore di diluizione nel calcolo finale.
16. È possibile eseguire questo saggio con qualunque metodo di lavaggio omologato.
17. Gli standard di desossipiridinolina, i campioni di controllo e il coniugato enzimatico sono sensibili alla luce. Evitare l'esposizione prolungata alla luce, specialmente alla luce del sole diretta o indiretta. Quando non sono in uso, conservare i reagenti in un luogo buio. Durante la manipolazione, i campioni e i reagenti non sono influenzati in modo significativo dalla luce normale, artificiale e di laboratorio, se trattati come da istruzioni per la procedura del saggio.
18. Se non è possibile mantenere la temperatura ambiente fra i 20–28°C e un'assorbanza di > 2,0 non è compatibile con il lettore per piastra, monitorare lo sviluppo del substrato nei pozzetti standard A; bloccare la reazione quando la densità ottica raggiunge 1,2–1,5; quindi leggere le strisce.

## PREPARAZIONE DEI REAGENTI

### Tampone di lavaggio - Fare riferimento alla nota procedurale nella sezione PROCEDURA DEL SAGGIO

Preparare la quantità necessaria di tampone di lavaggio 1X (fare riferimento alla tabella nella sezione PROCEDURA DEL SAGGIO) diluendo con acqua deionizzata il tampone di lavaggio concentrato in un rapporto di 1:10. Conservare a 20–28°C. Utilizzare il tampone di lavaggio 1X entro 21 giorni dalla preparazione.

**Istruzioni speciali di lavaggio:** preparare un tampone di lavaggio 1X come menzionato sopra e conservare a 2–8°C fino al momento dell'utilizzo.

### Coniugato enzimatico

Preparare il coniugato enzimatico entro 2 ore dall'utilizzo. Ricostituire ciascuna fiala necessaria di coniugato enzimatico (fare riferimento alla tabella) con 7 mL di tampone del saggio. Conservare il coniugato enzimatico ricostituito a 2–8°C fino al momento dell'utilizzo.

### Soluzione di substrato attiva

È necessario portare il tampone del substrato a 20–28°C prima dell'inizio del saggio (si consiglia da due ore a tutta la notte). Preparare la soluzione di substrato attiva entro 1 ora dall'utilizzo. Porre una tavoletta di substrato in ciascun flacone necessario di tampone di substrato a 20–28°C (fare riferimento alla tabella). Lasciar trascorrere 30–60 minuti per consentire alle tavolette di dissolversi. Agitare accuratamente i flaconi al fine di miscelarli completamente.

## CONSERVAZIONE

**Conservare i kit a 2–8°C.**

**Non congelare.**

**Conservare i reagenti inutilizzati a 2–8°C.**

## PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

È possibile eseguire il saggio MicroVue DPD con i prelievi della prima urina del mattino (FMV) o della seconda urina del mattino (SMV), privi di conservanti. Si consiglia di eseguire i prelievi prima delle ore 10:00 di mattina al fine di ovviare a qualunque possibile influenza della variazione diurna. Mantenere refrigerato il campione di urina (2–8°C) per una conservazione inferiore a 7 giorni oppure congelare il campione a ≤ -20°C per una conservazione più lunga. Non sottoporre il campione a più di 5 cicli di congelamento/ decongelamento. Evitare l'esposizione prolungata alla luce, specialmente alla luce del sole. Durante il trattamento di routine, i campioni non vengono influenzati dalla luce normale, artificiale e di laboratorio.

Durante la terapia di monitoraggio, prelevare i campioni della partenza prima di iniziare il trattamento. Per i confronti successivi, prelevare i campioni alla stessa ora del giorno in cui si erano prelevati i campioni alla partenza.

## PROCEDURA DEL SAGGIO

**Prima di iniziare il saggio, leggere completamente l'insero fornito con il prodotto.**

*Prima di procedere, fare riferimento a PREPARAZIONE DEI REAGENTI.*

**NOTA PROCEDURALE:** Il saggio MicroVue DPD è sensibile alle condizioni di lavaggio. È necessario completare l'intera fase di lavaggio entro 2 minuti. **Qualora fosse IMPOSSIBILE completare la fase di lavaggio entro 2 minuti, seguire le Istruzioni speciali di lavaggio contenute nelle sezioni PREPARAZIONE DEL REAGENTE e Incubazione del substrato.**

**Determinare la quantità necessaria di ciascun reagente per il numero di strisce da usare.**

#di strisce	4	6	8	12
# di campioni (sottoposti a test in duplicato)	8	16	24	40
Coniugato enzimatico (fiala)	1	1	2*	2*
Substrato (flacone)	1	1	2*	2*
Tampone di lavaggio 1X (mL)	100	150	200	300

\* Quando viene usato più di un flacone o di una fiala, unire i contenuti e miscelarli prima dell'uso.

### Incubazione del campione/coniugato enzimatico

1. Diluire i campioni, gli standard e i campioni di controllo in un rapporto di 1:10 con il tampone del saggio (ad esempio 50 µL di campione + 450 µL di tampone del saggio).
2. Rimuovere il telaio Stripwell dalla busta protettiva e il numero necessario di strisce rivestite (fare riferimento alla tabella). Verificare che la busta protettiva contenente qualunque striscia inutilizzata venga risigillata completamente.
3. Porre il numero desiderato di strisce rivestite nel telaio Stripwell. Etichettare le strisce per evitare di fare confusione nel caso di una rimozione accidentale dal telaio.
4. Aggiungere 50 µL di standard diluito, campione di controllo o campione a ciascun pozzetto di strisce rivestite. È necessario completare questa fase entro 30 minuti.

- Preparare il coniugato enzimatico entro 2 ore dall'utilizzo. Ricostituire ciascuna fiala necessaria di coniugato enzimatico (fare riferimento alla tabella) con 7 mL di tampone del saggio. Conservare il coniugato enzimatico ricostituito a 2–8°C fino al momento dell'utilizzo.
- Aggiungere a ciascun pozzetto 100 µL di coniugato enzimatico ricostituito. Coprire le strisce con il nastro fornito. Incubare per 2 ore (± 5 minuti) a 2–8°C. È necessario eseguire tale incubazione in un luogo buio.
- Preparare la soluzione di substrato attiva entro 1 ora dall'utilizzo. Porre una tavoletta di substrato in ciascun flacone necessario di tampone di substrato a 20–28°C (fare riferimento alla tabella). Lasciar trascorrere 30-60 minuti per consentire alle tavolette di dissolversi. Agitare accuratamente i flaconi al fine di miscelarli completamente.

### Fase di lavaggio

- Preparare la quantità necessaria di tampone di lavaggio 1X (fare riferimento alla tabella) diluendo con acqua deionizzata il tampone di lavaggio concentrato in un rapporto di 1:10. Capovolgere/svuotare manualmente le strisce. Aggiungere a ciascun pozzetto almeno 250 µL di tampone di lavaggio 1X e capovolgere/svuotare le strisce. Ripetere la procedura per altre due volte, per un totale di tre lavaggi. Asciugare accuratamente le strisce su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Mentre le strisce sono capovolte, pulire attentamente le estremità inferiori delle strisce con carta assorbente priva di lanugine per garantire che le estremità inferiori delle strisce siano pulite.

**Istruzioni speciali di lavaggio:** Eseguire la fase di lavaggio come descritto sopra, con un tampone di lavaggio 1X freddo (2–8°C). Dopo aver eseguito l'ultimo lavaggio, lasciar asciugare le strisce per 5–10 minuti su carta assorbente prima dell'aggiunta del substrato.

### Incubazione del substrato

- Aggiungere a ciascun pozzetto 150 µL di soluzione attiva di substrato.
- Incubare per 60 minuti (± 5 minuti) a 20–28°C.

### Arresto/Lettura

- Aggiungere a ciascun pozzetto 100 µL di soluzione bloccante. Aggiungere soluzione bloccante dello stesso tipo e a intervalli di tempo uguali all'aggiunta della soluzione di substrato.
- Leggere la densità ottica a 405 nm. Garantire che nei pozzetti non sia presente alcuna bolla grande e che le estremità inferiori delle strisce siano pulite. È necessario leggere le strisce entro **15 minuti** dall'aggiunta della soluzione bloccante.
- È necessario fare uso del software di quantizzazione con equazione di adattamento della curva di calibrazione a quattro parametri per l'analisi dei risultati del saggio MicroVue DPD.  
Equazione:  $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$
- Determinare la concentrazione dei campioni e dei campioni di controllo dalla curva standard.
- È necessario che i valori del campione di controllo si trovino all'interno della gamma specifica nel certificato di analisi fornito in dotazione con il kit.

## CONTROLLO DI QUALITÀ

Il certificato di analisi compreso in questo kit è specifico per il lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal laboratorio siano simili a quelli ottenuti da Quidel Corporation. Vengono forniti valori della densità ottica che sono da usare esclusivamente come direttiva. È possibile che i risultati ottenuti dal laboratorio differiscano.

Vengono forniti i valori di gamma per il controllo di qualità. I valori di controllo sono destinati a verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri per la definizione dei limiti di accettazione del saggio. Se i valori di controllo NON sono all'interno dei limiti di accettazione del laboratorio, i risultati del saggio devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i campioni.

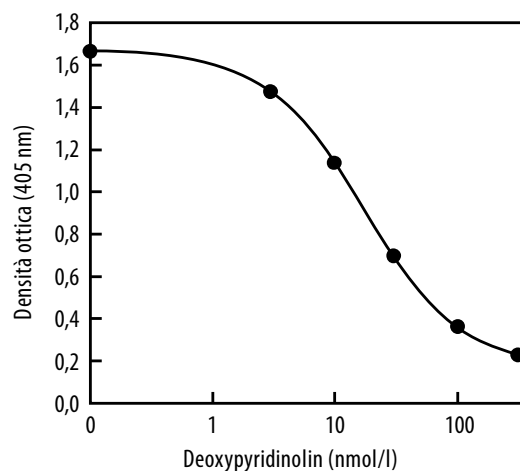
Se la densità ottica di MicroVue DPD Standard A è inferiore a 0,8, i risultati devono essere considerati discutibili e se possibile, si dovranno ripetere i campioni.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

È necessario correggere i risultati ottenuti dal saggio MicroVue DPD per le variazioni della concentrazione di urina dividendo il valore di DPD (nmol/L) per il valore della creatinina (mmol/L) di ciascun campione (creatinina mg/dL x 0,088 = mmol/L). I risultati finali di MicroVue DPD verranno espressi come nmol DPD/mmol creatinina.

### Curva standard rappresentativa

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



## LIMITI DELLA PROCEDURA

Mentre MicroVue DPD viene usato come indicatore del riassorbimento dell'osso, l'uso di tale test non è stato stabilito per prevedere lo sviluppo di osteoporosi o del rischio di fratture future. L'uso di questo test non è stato stabilito nell'iperparatoroidismo o ipertiroidismo. Quando si usa MicroVue DPD per monitorare la terapia, è possibile confondere i risultati in pazienti affetti da condizioni cliniche di cui sia nota l'influenza sul riassorbimento dell'osso, ad esempio metastasi dell'osso, in aggiunta alle malattie e alle condizioni sopra elencate. Interpretare i risultati di MicroVue DPD unitamente al quadro clinico e ad altri risultati diagnostici, non usarli come unico determinante per l'inizio o il cambiamento di una terapia.

## RISULTATI DEL CAMPIONE

I valori di riferimento di MicroVue DPD sono stati stabiliti per uomini sani (n = 121) e donne sane in premenopausa (n = 312) con oltre 25 anni di età. Per gli scopi della determinazione dei valori di riferimento, i soggetti sani sono stati definiti come:

- fondamentalmente sani, nessun disordine delle ossa, endocrino o cronico.
- con cicli mestruali regolari (nelle donne).
- nessuna gravidanza o allattamento al seno (donne).
- nessuna assunzione di farmaci attualmente accertata che influenzano il metabolismo osseo (ad esempio corticosteroidi, GnRH-analoghi, anticonvulsivi, eparina, cura della tiroide).

È possibile che i valori siano influenzati da alcuni fattori come bassa produzione di estrogeni, minore assunzione di calcio, bassa attività fisica o malattie accertate che influenzano il metabolismo dell'osso, quali l'osteoporosi, il morbo di Paget, l'iperparatiroidismo, l'ipertiroidismo e la metastasi dell'osso. La mancanza di estrogeni in donne in postmenopausa può causare un elevato riassorbimento dell'osso. Si suggerisce di usare il valore di riferimento della premenopausa per interpretare i risultati in donne in postmenopausa. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca il proprio valore di riferimento normale. I valori vengono espressi come intervalli di riferimento non parametrici (90% CI).

	Età (anni)	Media (nmol DPD/mmol Cr)	DS	Gamma
Donne	25 - 44	5,0	1,4	3,0 - 7,4
Uomini	25 - 55	3,8	1,0	2,3 - 5,4

La variabilità attesa all'interno di uno stesso soggetto è stata determinata dai campioni di urina di 49 soggetti sani prelevati per cinque giorni non consecutivi nell'arco di due settimane. La variazione longitudinale dell'individuo all'interno dello stesso soggetto era del 15,5%. La variabilità fra i soggetti viene riflessa negli intervalli di riferimento non parametrici sopraelencati.

## CARATTERISTICHE DEL METODO

### Specificità dell'anticorpo

L'anticorpo monoclonale anti-DPD ha un'affinità selettiva elevata per la DPD libera e un legame trascurabile con le peptidi di DPD e con la piridinolina (PYD) legata con le peptidi o libera.

	Reattività in %
DPD libera	100 %
PYD libera	< 1 %
Peptidi di PYD/DPD	
≥ 1000 MW	< 2,5 %
≥ 3500 MG	< 2,5 %

### Sensibilità

Il limite di rilevamento minimo del saggio MicroVue DPD è di 1,1 nmol/L, determinato dal limite superiore di 3 DS in uno studio a standard zero.

### Recupero – Recupero dei picchi

Il recupero dei picchi è stato determinato aggiungendo una quantità nota di DPD purificata ai campioni di urina con livelli diversi di DPD endogena. I risultati tipici vengono forniti di seguito.

Campione	Endogeno (nmol/L)	Aggiunto (nmol/L)	Osservato (nmol/L)	Recupero (%)
1	3,1	27,3	32,0	106
2	11,2	27,3	38,8	101
3	18,2	27,3	44,9	98

### Recupero - Linearità

La linearità è stata determinata diluendo in modo seriale i campioni e confrontando i valori osservati con i risultati attesi. I risultati tipici vengono forniti di seguito.

Campione	Fattore di diluizione	Osservato (nmol/L)	Atteso (nmol/L)	Recupero (%)
1	non diluito	65,5	-	-
	1:2	31,8	32,8	97
	1:4	15,4	16,4	94
2	non diluito	84,6	-	-
	1:2	39,3	42,3	93
	1:4	19,4	21,1	92
3	non diluito	132,6	-	-
	1:2	65,6	66,3	99
	1:4	30,2	33,2	91
	1:8	16,8	16,6	101

### Precisione

La precisione all'interno di una stessa corsa è stata determinata per ≥ 21 ripetizioni di 3 campioni su 2 piastre da ciascuno dei 3 lotti di kit (6 piastre in totale). La precisione fra le corse è stata determinata dall'analisi di 3 campioni in 9 piastre separate da ciascuno dei 3 lotti di kit (27 piastre in totale). I campioni mostrati qui sotto rappresentano una gamma di valori in nmol/L. Per una donna con creatinina a 4,5 mmol/L, i campioni da 1 a 3 rappresentano un riassorbimento normale basso, normale alto ed elevato (2,4 nmol/mmol, 6,7 nmol/mmol e 38,8 nmol/mmol, rispettivamente).

Campione	DPD (nmol/L de DPD)	All'interno di una stessa corsa <sup>1</sup> CV%	Fra le corse <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 corse

## STUDI CLINICI

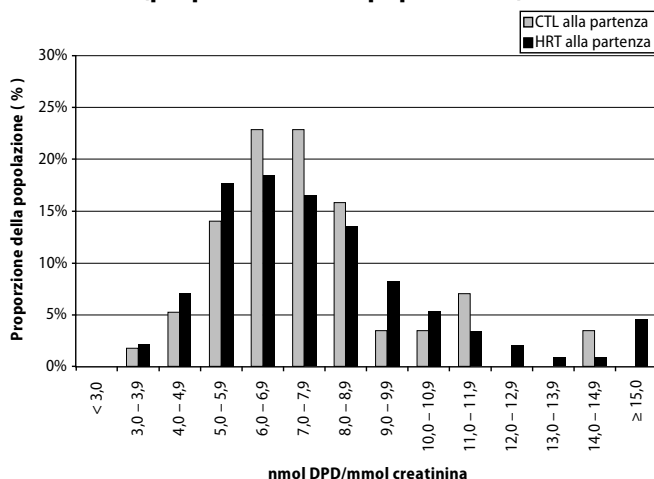
### Uso di MicroVue DPD per il monitoraggio della terapia ormonale anti-riassorbente in donne in postmenopausa

Uno studio policentrico, randomizzato e controllato, è stato condotto con successo per stabilire la sicurezza e l'efficacia del saggio MicroVue DPD, al fine di monitorare i cambiamenti dell'escrezione urinaria di DPD associata a una terapia anti-riassorbente con estrogeni/progestina. L'accresciuto riassorbimento osseo e la perdita significativa dell'osso sono spesso associati alla mancanza di estrogeni in postmenopausa. La sostituzione degli estrogeni ha dimostrato di diminuire efficacemente il riassorbimento e di proteggere la massa ossea esistente.<sup>7-10</sup>

I soggetti erano donne in postmenopausa, con un'età compresa tra 45 e 64 anni (in media  $56 \pm 4$  anni), che hanno subito una menopausa naturale o chirurgica negli ultimi 10 anni. Alla partenza, i soggetti idonei sono stati randomizzati in un gruppo di trattamento attivo (HRT) con: Premarin® (0,625 mg al giorno) con progestina placebo, Premarin (0,625 mg al giorno) e una progestina attiva (Provera® 2,5 mg/al giorno, con continuità, Provera 10 mg/al giorno, ciclicamente o progesterone micronizzato 200 mg/al giorno, ciclicamente); oppure in un gruppo di controllo (CTL) con: estrogeno placebo e progestina placebo. Da tutti i soggetti sono stati ottenuti i primi o i secondi campioni di urina del mattino, alla partenza e a 12 mesi. I risultati di MicroVue DPD sono stati corretti per la clearance della creatinina e espressi come nmol DPD/mmol creatinina.

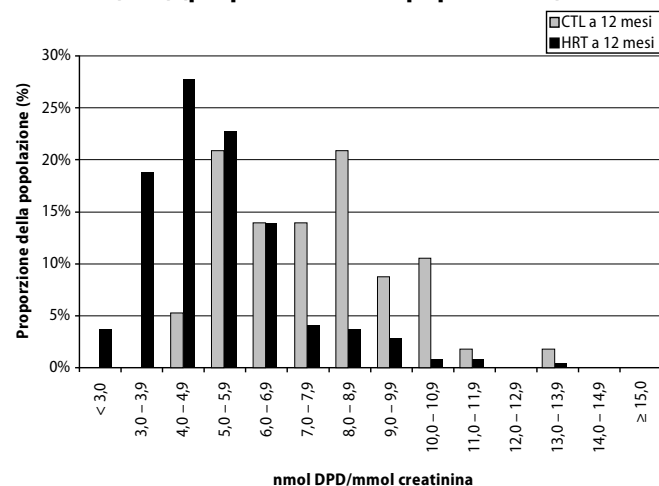
La concentrazione media di DPD alla partenza ( $\pm 1$ DS) ( $7,56 \pm 2,27$  in contrapposizione a  $7,94 \pm 3,25$  nmol/mmol,  $p = 0,304$ ) e la BMD della colonna vertebrale lombare ( $0,97 \pm 0,17$  in contrapposizione a  $0,97 \pm 0,15$  g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,792$ ) erano simili per i gruppi CTL e HRT. Le distribuzioni dei valori di DPD alla partenza in HRT e CTL sono descritte nella Figura 1 in proporzione rispetto alla popolazione dello studio.

**Figura 1: Distribuzione dei livelli di DPD alla partenza (proporzione della popolazione)**



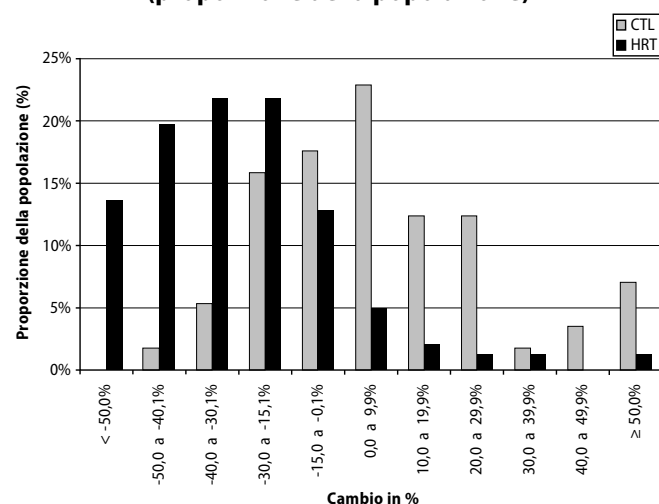
La DPD era significativamente più bassa per HRT che per CTL a 12 mesi ( $5,27 \pm 1,78$  in contrapposizione a  $8,08 \pm 3,63$  nmol/mmol,  $p < 0,00001$ ). A 12 mesi, i soggetti del gruppo HRT erano quelli che, più probabilmente dei soggetti CTL, avevano una concentrazione di  $DPD \leq 7,4$  nmol/mmol (89% in contrapposizione al 51%,  $p < 0,00001$ ) anche se le proporzioni alla partenza erano simili per i due gruppi (CTL 56%, HRT 53%,  $\leq 7,4$  nmol/mmol). Le distribuzioni dei valori di DPD dopo 12 mesi nei gruppi HRT e CTL sono descritte nella Figura 2.

**Figura 2: Distribuzione dei livelli di DPD dopo 12 mesi di terapia con estrogeni/progestina (HRT) o placebo (CTL) (proporzione della popolazione)**



La concentrazione media di DPD ( $\pm 1$ DS) nei soggetti CTL è aumentata leggermente rispetto alla partenza al +11,7% ( $\pm 49,7\%$ ) a 12 mesi ( $p = 0,278$ ), mentre le concentrazioni di DPD nei soggetti HRT è diminuita dal momento della partenza a -29,1 ( $\pm 23,8\%$ ) a 12 mesi ( $p < 0,0001$ ). Le distribuzioni del cambio di percentuale rispetto alla partenza nei valori DPD dopo 12 mesi nei gruppi HRT e CTL sono descritte nella Figura 3.

**Figura 3: Distribuzione del cambio di percentuale nei livelli DPD dopo 12 mesi di terapia con estrogeni/progestina (HRT) o placebo (CTL) (proporzione della popolazione)**



A 12 mesi, i soggetti del gruppo HRT hanno aumentato la BMD della colonna vertebrale lombare se confrontati con quelli del CTL ( $p < 0,00001$ ) come mostrato nella tabella 1.

**Tabella 1. Modifiche in BMD della colonna vertebrale (media  $\pm$  DS)**

	n	Alla partenza (g/cm <sup>2</sup> )	12 mesi (g/cm <sup>2</sup> )	$\Delta$ (%)
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

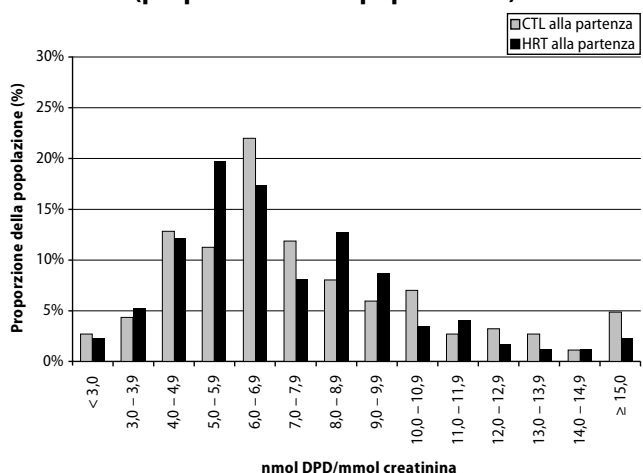
Questi risultati indicano che il saggio MicroVue DPD è sicuro ed efficace per il monitoraggio dell'effetto anti-riassorbente della terapia sostitutiva dell'ormone in donne in postmenopausa.

#### Uso di MicroVue DPD per il monitoraggio della terapia anti-riassorbente con bisfosfonato nell'osteoporosi

Uno studio policentrico, randomizzato e controllato è stato condotto con successo per stabilire la sicurezza e l'efficacia del saggio MicroVue DPD, al fine di monitorare i cambiamenti nell'escrezione urinaria di DPD associata a una terapia anti-riassorbente con amino-bisfosfonato (alendronato). I soggetti erano donne in postmenopausa, con un'età compresa tra 45 e 84 anni (media  $64 \pm 7$  anni), affette da osteoporosi (basata sulla presentazione clinica o sulla BMD della colonna vertebrale lombare alla partenza inferiori di più di 2,5 deviazioni standard rispetto alla media delle donne mature in premenopausa). Al momento della partenza, i soggetti idonei sono stati randomizzati in modo da ricevere 10 mg di alendronato e 500 mg di calcio al giorno (ALN) oppure 500 mg di calcio al giorno (CTL). I secondi campioni di urina del mattino sono stati ottenuti alla partenza, a 3, 6 e 12 mesi da tutti i soggetti. I risultati di MicroVue DPD sono stati corretti per la clearance della creatinina e espressi come nmol DPD/mmol creatinina.

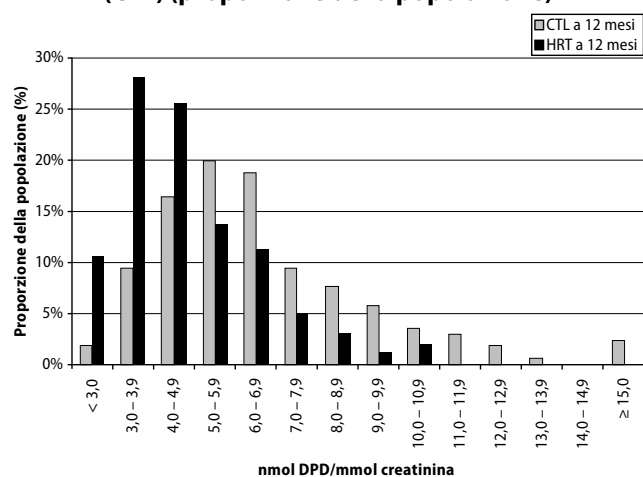
La concentrazione media di DPD alla partenza ( $\pm 1$  DS) ( $7,35 \pm 3,30$  in contrapposizione a  $7,74 \pm 3,47$  nmol/mmol,  $p = 0,278$ ) e la BMD della colonna vertebrale lombare ( $0,75 \pm 0,09$  in contrapposizione a  $0,74 \pm 0,10$  g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,426$ ) erano simili per ALN e CTL. Le distribuzioni dei valori DPD alla partenza in ALN e CTL sono descritte nella Figura 4 in proporzione rispetto alla popolazione dello studio.

**Figura 4: Distribuzione dei livelli di DPD alla partenza (proporzione della popolazione)**



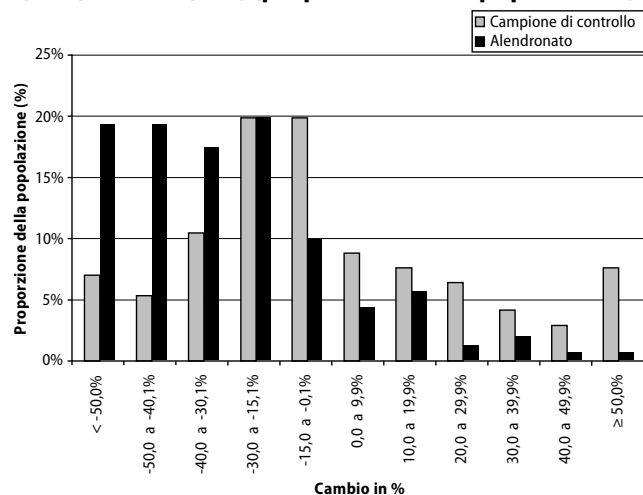
La DPD era significativamente più bassa per ALN che per CTL a 3 mesi ( $5,45 \pm 2,61$  in contrapposizione a  $7,56 \pm 3,08$  nmol/mmol,  $p < 0,00001$ ), a 6 mesi ( $4,83 \pm 1,94$  in contrapposizione a  $7,09 \pm 3,33$  nmol/mmol,  $p < 0,00001$ ) e 12 mesi ( $4,78 \pm 1,75$  in contrapposizione a  $6,73 \pm 2,98$  nmol/mmol,  $p < 0,00001$ ). A 3, 6 e 12 mesi, rispettivamente l'84, 89 e 91% dei soggetti ALN avevano una concentrazione di DPD  $\leq 7,4$  nmol/mmol. I soggetti del gruppo ALN erano quelli che, più probabilmente dei soggetti CTL, avevano una concentrazione di DPD  $\leq 7,4$  nmol/mmol in tutti i momenti ( $p = 0,002$ ) anche se le proporzioni alla partenza erano simili per i due gruppi (rispettivamente CTL 60,4%, ALN 57,8%  $\leq 7,4$  nmol/mmol). Le distribuzioni dei valori di DPD dopo 12 mesi nei gruppi ALN e CTL sono descritte nella Figura 5.

**Figura 5: Distribuzione dei livelli di DPD dopo 12 mesi di terapia con alendronato (ALN) o calcio (CTL) (proporzione della popolazione)**



La concentrazione media di DPD ( $\pm 1$  DS) nei soggetti CTL è diminuita gradualmente rispetto alla partenza al -4,9% ( $\pm 34,9\%$ ) a 12 mesi ( $p = 0,003$ ), cosa che può riflettere l'effetto limitato di preservazione dell'osso svolto dal calcio.<sup>15</sup> Le concentrazioni medie di DPD nei soggetti del gruppo ALN è diminuita del  $22,9 \pm 37,4\%$  a 3 mesi, del  $28,6 \pm 25,8\%$  a 6 mesi e del  $29,5 \pm 26,7\%$  a 12 mesi. Le distribuzioni del cambio di percentuale rispetto alla partenza nei valori DPD dopo 12 mesi nei gruppi ALN e CTL sono descritte nella Figura 6.

**Figura 6: Distribuzione del cambio di percentuale nei livelli di DPD dopo 12 mesi di terapia con alendronato (ALN) o calcio (CTL) (proporzione della popolazione)**



A 12 mesi, i soggetti del gruppo ALN hanno aumentato la BMD della colonna vertebrale lombare se confrontati con quelli del CTL ( $p < 0,00001$ ) come mostrato nella tabella 2.

**Tabella 2. Modifiche in BMD della colonna vertebrale lombare (media  $\pm$  DS)**

	n	Alla partenza (g/cm <sup>2</sup> )	12 mesi (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

Questi risultati indicano che il saggio MicroVue DPD è sicuro ed efficace per il monitoraggio dell'effetto anti-riassorbente della terapia dell'amino-bisfosfonato (alendronato) fra soggetti affetti da osteoporosi.

### Studi addizionali

Sono stati eseguiti studi clinici per valutare i livelli di desossipiridinolina nell'urina ottenuti con il saggio MicroVue DPD riferito ai livelli ottenuti con le analisi di HPLC<sup>14</sup> e le diagnosi cliniche.

Il primo di tali studi è stato condotto in siti per indagini clinica usando 54 campioni di volontari sani e 140 campioni di pazienti con disordini ossei accertati (compresa l'osteoporosi, il morbo di Paget, iperparatiroidismo e ipertiroidismo). Tali malattie spesso comportano un elevato riassorbimento dell'osso e questo gruppo di soggetti è stato considerato una popolazione a rischio. Tuttavia al momento del prelievo del campione non si prevedeva che tutti i soggetti avessero un elevato riassorbimento dell'osso. Centotré dei 140 pazienti affetti da disordine non avevano valori elevati di piridinolina quando questa è stata misurata con HPLC. I valori di desossipiridinolina di MicroVue DPD in soggetti sani andavano da 2,3 a 11,2 nmol/mmol e nei pazienti andavano da 1,2 a 37,3 nmol/mmol.

Nello studio, il saggio MicroVue DPD è stato confrontato con il metodo di ricerca HPLC<sup>14</sup> per la misurazione di piridinolina. In uno studio di 84 soggetti sani, è stata determinata la soglia di HPLC in 50 nmol/mmol per gli uomini e in 60 nmol/mmol per le donne (limite superiore dell'intervallo di confidenza del 95% per ciascun genere). Usando piridinolina elevata determinata da HPLC come metodo di classificazione, è stata usata la tecnica delle caratteristiche operative del ricevente (ROC) per definire una sensibilità e specificità relative e ottimali nella popolazione descritta. La sensibilità e la specificità relative vengono presentate nella tabella 3. Viene presentata una piccola tabella della contingenza che mostra il numero di soggetti in ciascuna classificazione nella Figura 7.

**Tabella 3**

MicroVue DPD	
Sensibilità relativa	69 %
Specificità	87 %

**Figura 7**

		HPLC Elevata +	PYD Non elevata -
MicroVue DPD	+	31	20
	-	14	129

Nel secondo studio, i risultati del saggio MicroVue DPD sono stati confrontati in una popolazione mista di 39 campioni di soggetti sani e 69 campioni di pazienti con il morbo di Paget. Sebbene il morbo di Paget rappresenti un modello per l'identificazione del riassorbimento attivo dell'osso, in questo studio alcuni pazienti sono stati sottoposti a trattamento o è possibile che siano stati considerati in remissione e non abbiano avuto un elevato riassorbimento dell'osso al momento del prelievo del campione. In questo studio, i soggetti sani andavano da 2,3 a 6,4 nmol/mmol. I pazienti colpiti dal morbo di Paget andavano da 1,7 a 50,4 nmol/mmol.

Con la diagnosi del morbo di Paget come metodo di classificazione, è stata usata la tecnica ROC per definire una sensibilità e specificità relative e ottimali in tale popolazione. La sensibilità e specificità relative sono mostrate nella tabella 4. Una piccola tabella della contingenza viene mostrata nella Figura 8.

**Tabella 4**

MicroVue DPD	
Sensibilità relativa	91 %
Specificità	97 %

**Figura 8**

		Diagnosi di Paget	
		Si	No
MicroVue DPD	+	63	1
	-	6	38

### ASSISTENZA

Per servizi al di fuori degli Stati Uniti, contattare il distributore local. Le ulteriori informazioni circa Quidel, i nostri prodotti ed i nostri distributori possono essere trovate sul nostro Web site a [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

Protetto dai brevetti statunitensi n. 5,620,861, 5,700, 694, 6,121, 002, e 5,283,197.

## BIBLIOGRAFIA

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.

## GLOSSARIO



Consulti le istruzioni per uso sul CDROM



Finalità d'uso

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