

Um imunoenensaio enzimático para a quantificação de ligações cruzadas de desoxipiridinolina (DPD) na urina humana

MicroVue™ DPD EIA Sumário

Preparação do Reagente e da Amostra

- ❑ Preparar o Conjugado Enzimático com Tampão de Análise; conservar a 2–8°C. (7 mL de Tampão de Análise fria para cada frasco de de Conjugado Enzimático.)
- ❑ Diluir as amostras, padrões e controlos na proporção de 1:10 com tampão de análise (por ex. 50 µL de Amostra + 450 µL de Tampão de Análise)

Procedimento de Ensaio

Adicionar 50 µL de Padrão, Controlo ou Amostra diluídos a cada poço das tiras revestidas

Adicionar 100 µL de Conjugado Enzimático a cada poço

Incubar durante 120 ± 5 minutos a 2–8°C no escuro

- ❑ Preparar a Solução de Substrato (30 – 60 min antes do uso) Colocar um Comprimido de Substrato em cada frasco de Tampão de Substrato (Agitar vigorosamente)
- ❑ Preparar o Tampão de Lavagem 1X (Diluir o Tampão de Lavagem 10X concentrado na proporção de 1:10 com água desionizada)

Lavar 3X com la Tampão de Lavagem

Adicionar 150 µL de Solução de Substrato

Incubar durante 60 ± 5 minutos a 20–28°C

Adicionar 100 µL de Solução de Paragem

Ler a densidade óptica a 405 nm. É necessário utilizar uma equação de regressão adequada a uma curva de calibração de 4 parâmetros para analisar os resultados

$$y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$$

iu FINALIDADE

O MicroVue DPD é um ensaio urinário que proporciona uma medida quantitativa da excreção de ligações cruzadas de desoxipiridinolina (DPD) como um indicador da reabsorção óssea. Os níveis aumentados de DPD urinária indicam o aumento da reabsorção óssea nos indivíduos.

A medição da DPD destina-se a ser utilizada como auxiliar na monitorização das alterações na reabsorção óssea nas mulheres depois da menopausa, submetidas a terapêutica anti-reabsorção, hormonal ou com bifosfonatos, e em indivíduos diagnosticados com osteoporose.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Aproximadamente 90% da matriz orgânica do osso é colagénio tipo I, uma proteína em hélice tripla.¹ O colagénio tipo I do osso tem ligações cruzadas com moléculas específicas que proporcionam rigidez e resistência. As ligações cruzadas do colagénio tipo I maduro no osso são as ligações cruzadas piridínicas, a piridinolina (PYD) e a desoxipiridinolina (DPD).^{1,2} A DPD é formada pela acção enzimática de lisil oxidase sobre o aminoácido lisina.³ É libertada para a circulação durante o processo de reabsorção óssea.^{2,5} A DPD é excretada não-metabolizada na urina e não é afectada pela dieta,⁶ o que a torna adequada para avaliação da reabsorção.

O osso está constantemente sujeito a um processo metabólico designado por renovação.^{2,7} Tal inclui um processo de degradação, reabsorção óssea, mediado pela acção dos osteoclastos, e um processo de construção, formação óssea, mediado pela acção dos osteoblastos.^{2,7} A renovação é necessária para a manutenção e saúde geral do osso e está bem interligada; ou seja, a reabsorção e a formação estão em equilíbrio.⁷ Nos estados anormais do metabolismo ósseo este processo deixa de estar interligado e, quando a reabsorção supera a formação, o resultado é uma perda líquida de osso.⁷ A medição de produtos de degradação específicos da matriz óssea proporciona dados analíticos da velocidade do metabolismo ósseo.^{2,4,5}

A osteoporose é uma doença metabólica óssea caracterizada por uma renovação óssea anómala. É uma doença sistémica do esqueleto caracterizada por uma baixa massa óssea e deterioração microarquitónica do tecido ósseo, com o conseqüente aumento da susceptibilidade às fracturas.⁸ O tipo mais frequente de osteoporose ocorre nas mulheres após a menopausa como resultado da deficiência de estrogénios produzida pela cessação da função dos ovários.⁷ A reposição dos níveis de estrogénios anteriores à menopausa pela terapêutica de substituição impede a perda óssea e a osteoporose.⁷⁻¹⁰ A utilização de estrogénios e de uma classe de compostos conhecidos como bifosfonatos constitui uma terapêutica que inibe a reabsorção e que pode ser utilizada para impedir a perda óssea ou tratar a osteoporose.⁷⁻¹² A osteoporose pode também resultar do facto de não ser atingida uma massa óssea máxima durante os anos de crescimento, de um desequilíbrio da renovação óssea relacionado com a idade, com um excesso líquido de reabsorção, e de uma série de situações clínicas e terapêuticas que induzem a perda óssea ou desequilíbrios na renovação óssea.⁷ Estas incluem doenças endócrinas como o hipogonadismo, o hipertireoidismo, o hiperparatiroidismo e o hipercortisolismo; doenças gastrointestinais relacionadas com a nutrição e o metabolismo dos minerais; doenças do tecido conjuntivo; mieloma múltiplo; imobilização crónica, alcoolismo ou tabagismo; e terapêutica crónica com

heparina ou corticosteróides.⁷ Outras doenças caracterizadas pela renovação óssea anómala incluem a doença de Paget e os cancros com metástases ósseas.³ Para o ensaio MicroVue DPD recorreu-se a uma tecnologia de anticorpos para produzir um anticorpo monoclonal que demonstra especificidade para DPD.¹³ A especificidade do anticorpo monoclonal utilizado no ensaio MicroVue DPD permite a quantificação simples, conveniente, reprodutível e directa da DPD na urina.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O ensaio MicroVue DPD é um imunoensaio enzimático competitivo num formato de tira de poços de microtitulação que utiliza um anticorpo monoclonal anti-DPD revestido na tira para captar a DPD. A DPD na amostra compete com a DPD-fosfatase alcalina conjugadas para o anticorpo, sendo a reacção detectada com um substrato de pNPP. Os resultados do ensaio MicroVue DPD são corrigidos para uma concentração urinária pela creatinina.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

96 ensaios para ligações cruzadas de desoxipiridinolina

O kit MicroVue DPD EIA contém o seguinte:

A			
B	DPD Standards A - F	Peças 4203 a 4208	0,3 mL cada
C	(A = 0, B = 3, C = 10, D = 30, E = 100, F = 300 nmol/L DPD)		
D	DPD purificada proveniente de osso de bovino em 10 mmol/L de ácido fosfórico contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
E			
F			
L	Controlos inferiores/superiores		
H		Peças 4209, 4210	0,3 mL cada
	DPD purificada proveniente de osso de bovino em 10 mmol/L de ácido fosfórico contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
1	Tiras revestidas	Peça 4661	12 de cada
	Anticorpo anti-DPD monoclonal murínico purificado absorvido em tiras de poços		
2	Solução de paragem da reacção	Peça 4702	15 mL
	NaOH 0,5N		
3	Tampão de lavagem 10X	Peça 4703	55 mL
	Detergente não-iónico numa solução tamponada contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
4	Tampão de análise	Peça 4704	55 mL
	Detergente não-iónico numa solução tamponada contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
5	Tampão de substrato	Peça 4705	3 x 10 mL
	Uma solução de dietanolamina e cloreto de magnésio contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
6	Comprimidos de substrato	Peça 0012	3 x 20 mg
	p-nitrofenil fosfato		
7	Conjugado enzimático	Peça 4202	3 de cada
	DPD liofilizada, purificada de osso de bovino, conjugada com fosfatase alcalina contendo sais tampão e estabilizadores		
	Cobertura para tiras da placa	Peça 0047	3 de cada

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipetas para distribuição de 50 a 300 µL
- Itens adequados para medição de líquidos de 7 a 300 mL
- Recipiente para diluição do tampão de lavagem
- Tubos para diluição de amostras, padrões e controlos
- Água desionizada ou destilada
- Leitor de microplacas com capacidade de leitura a 405 nm
- Software adequado a uma regressão da curva de calibração de 4 parâmetros
- Valores da creatinina (mmol/L) para as amostras de urina

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
2. Tratar todas as amostras como material que possa constituir perigo biológico. Seguir as precauções universais ao manusear o conteúdo deste kit e quaisquer amostras dos doentes.
3. Eliminar os recipientes e o conteúdo não utilizado de acordo com os requisitos regulamentares federais, estaduais e locais.
4. Utilizar os reagentes fornecidos como uma unidade inteira antes da data de validade inscrita na etiqueta da embalagem.
5. Utilizar vestuário de protecção, luvas e protecção ocular/facial adequados ao manusear o conteúdo deste kit.
6. Conservar os reagentes do ensaio conforme indicado.
7. Não utilizar as tiras revestidas se a bolsa estiver perfurada.
8. Analisar cada amostra em duplicado.
9. NaOH 0,5N é considerado corrosivo e pode provocar queimaduras graves. Não ingerir. Evitar o contacto com a pele, os olhos ou o vestuário. Se houver contacto, lavar com água. Em caso de ingestão, consultar um médico.
10. A azida de sódio é utilizada como conservante. O contacto com tampões ou a respectiva ingestão acidental contendo azida de sódio pode provocar irritação na pele, nos olhos ou na boca. Utilizar os tampões apenas para os fins previstos e evitar o contacto com ácidos. A azida de sódio pode reagir com as canalizações de chumbo e de cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Aquando da sua eliminação, deixe correr muita água de modo a evitar uma acumulação deste produto.
11. O tampão de substrato contém dietanolamina e poderá provocar irritação nos olhos e/ou pele em caso de contacto prolongado. Utilizar vestuário de protecção, luvas e protecção ocular/facial adequados. As zonas que tenham estado em contacto com este produto deverão ser imediatamente lavadas com água e sabão.
12. Os padrões e controlos encontram-se em 10 mmol/L de ácido fosfórico. Evitar o contacto com a pele, os olhos ou o vestuário. Não ingerir. Se houver contacto, lavar com água. Em caso de ingestão, consultar um médico.
13. Para assegurar o fornecimento atempado dos reagentes, recomenda-se a utilização de pipetas multicanal ou de repetição.

14. Para uma medição precisa de amostras, adicionar as amostras e os padrões com precisão. Utilizar a pipeta com cuidado recorrendo apenas a equipamento calibrado.
15. Diluir as amostras superiores a 300 nmol/L em tampão de análise e analisar novamente. Incluir o factor de diluição no cálculo final.
16. Este ensaio pode ser efectuado com qualquer método de lavagem validado.
17. Os padrões de desoxipiridinolina, os controlos e o conjugado enzimático são sensíveis à luz. Evitar a exposição prolongada à luz, especialmente à luz solar directa ou indirecta. Conservar os reagentes no escuro quando não estiverem a ser utilizados. As amostras e os reagentes não são afectados de forma significativa pela luz artificial normal de laboratório, quando manuseados conforme indicado no Procedimento de Ensaio.
18. Se não for possível manter a temperatura ambiente entre 20 e 28°C e se uma absorvência de > 2,0 não for compatível com o seu leitor de placas, monitorize o desenvolvimento do substrato nos poços de Padrão A; pare a reacção quando a densidade óptica atingir 1,2 a 1,5; a seguir, leia as tiras.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de lavagem – Ver Nota do Procedimento na secção PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro na secção PROCEDIMENTO DE ENSAIO) diluindo o tampão de lavagem 10X concentrado na proporção de 1:10 com água desionizada. Conservar a 20–28°C. Utilizar o tampão de lavagem 1X nas 21 dias seguintes à preparação.

Instruções especiais de lavagem: Preparar o tampão de lavagem 1X conforme descrito acima e conservar a 2–8°C até ser utilizado.

Conjugado enzimático

Preparar o conjugado enzimático 2 horas antes da sua utilização. Reconstituir cada frasco necessário de conjugado enzimático (ver quadro) com 7 mL de tampão de análise. Conservar o conjugado enzimático reconstituído a 2–8°C até ser utilizado.

Solução de substrato de trabalho

O tampão de substrato deve ser colocado à temperatura de 20–28°C antes de iniciar o ensaio. (Duas horas ou de um dia para o outro é o tempo recomendado.) Preparar a solução de substrato de trabalho 1 hora antes da sua utilização. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário a 20–28°C (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente.

ARMAZENAMENTO

Conservar o kit a 2–8°C.

Não congelar.

Conservar os reagentes não utilizados a 2–8°C.

COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

O ensaio MicroVue DPD pode ser realizado utilizando colheitas da primeira urina da manhã ou da segunda urina da manhã, colhidas sem conservantes. Recomenda-se que as colheitas sejam efectuadas antes das 10:00 horas para obviar qualquer influência potencial da variação diurna. Manter a amostra de urina refrigerada (2–8°C) se o período de conservação for inferior a 7 dias, ou congelar a amostra a ≤ -20°C para um período de conservação mais longo. Não sujeitar a amostra a mais de 5 ciclos de congelação e descongelação. Evitar a exposição prolongada à luz, especialmente à luz solar. Durante o processamento de rotina, as amostras não são afectadas pela luz artificial normal de laboratório.

Ao monitorizar a terapêutica, efectuar a colheita das amostras da linha basal antes de iniciar o tratamento. Para as comparações posteriores, efectuar a colheita de amostras à mesma hora do dia em que foi efectuada a colheita da amostra da linha basal.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Ler o folheto informativo completo antes de iniciar o ensaio.

Ver *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES* antes de prosseguir.

NOTA DO PROCEDIMENTO: O ensaio MicroVue DPD é sensível às condições de lavagem. O **passo de lavagem completo** deverá estar concluído em **2 minutos**. Se o **passo de lavagem NÃO PUDE** estar concluído em **2 minutos**, siga as *Instruções Especiais de Lavagem* que se encontram nas secções *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES* e *Fase de Lavagem*.

Determine a quantidade de cada reagente necessário para o número de tiras que vão ser utilizadas.

N.º de tiras	4	6	8	12
N.º de amostras (analisadas em duplicado)	8	16	24	40
Conjugado enzimático (frasco)	1	1	2*	2*
Substrato (frasco)	1	1	2*	2*
Tampão de lavagem 1X (mL)	100	150	200	300

* Quando se vai utilizar mais do que um frasco, combinar o conteúdo e misturar antes de utilizar.

Incubação da amostra/conjugado enzimático

1. Diluir as amostras, padrões e controlos na proporção de 1:10 com tampão de análise (por exemplo, 50 µL de amostra + 450 µL de tampão de análise).
2. Remover a armação das tiras de poços e retirar o número necessário de tiras revestidas da bolsa (ver quadro). Verificar se a bolsa que contém as tiras não usadas fica perfeitamente selada.
3. Colocar o número pretendido de tiras revestidas na armação das tiras de poços. Rotular as tiras para evitar que se misturem em caso de remoção acidental da armação.
4. Adicionar 50 µL de padrão, controlo ou amostra diluídos a cada poço das tiras revestidas. Este passo deverá estar concluído em 30 minutos.
5. Preparar o conjugado enzimático 2 horas antes da sua utilização. Reconstituir cada frasco necessário de conjugado enzimático (ver quadro) com 7 mL de tampão de análise. Conservar o conjugado enzimático reconstituído a 2–8°C até ser utilizado.

- Adicionar 100 µL de conjugado enzimático reconstituído a cada poço. Cobrir as tiras com a cobertura para tiras fornecida. Incubar durante 2 horas (± 5 minutos) a 2–8°C. Esta incubação deverá ser efectuada no escuro.
- Preparar a solução de substrato de trabalho 1 hora antes da sua utilização. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário à 20–28°C (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente.

Passo de lavagem

- Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro) diluindo o tampão de lavagem 10X na proporção de 1:10 com água desionizada. Inverter/esvaziar manualmente as tiras. Adicionar pelo menos 250 µL de tampão de lavagem 1X a cada poço e inverter/esvaziar manualmente as tiras. Repetir mais duas vezes para um total de três lavagens. Secar as tiras comprimindo-as vigorosamente sobre toalhas de papel após a última lavagem. Enquanto as tiras estão invertidas, limpar cuidadosamente o fundo das tiras com uma toalha de papel que não largue fibras para assegurar que o fundo das tiras se encontra limpo

Instruções especiais de lavagem: Executar o passo de lavagem conforme descrito acima, utilizando tampão de lavagem 1X frio (2–8°C). Após a última lavagem, deixar as tiras escorrer durante 5 a 10 minutos sobre toalhas de papel antes de adicionar o substrato.

Incubação do substrato

- Adicionar 150 µL de solução de substrato de trabalho a cada poço.
- Incubar durante 60 minutos (± 5 minutos) a 20–28°C.

Parar/Ler

- Adicionar 100 µL de solução de paragem a cada poço. Adicionar a solução de paragem seguindo o mesmo padrão e os mesmos intervalos de tempo utilizados na adição da solução de substrato.
- Ler a densidade óptica a 405 nm. Assegurar que não existem bolhas de grandes dimensões nos poços e que o fundo das tiras está limpo. As tiras devem ser lidas **15 minutos** depois da adição da solução de paragem.
- É necessário utilizar software de quantificação com uma equação de regressão adequada a uma curva de calibração de 4 parâmetros para analisar os resultados do ensaio MicroVue DPD.
Equação: $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$
- Determinar a concentração de amostras e controlos a partir da curva padrão.
- Os valores de controlo devem estar dentro dos limites especificados no Certificado de Análise fornecido com o kit.

CONTROLO DE QUALIDADE

O Certificado de Análise incluído neste kit é específico do lote e deve ser utilizado para verificar se os resultados obtidos pelo seu laboratório são semelhantes aos obtidos na Quidel Corporation. Os valores da densidade óptica são fornecidos e devem ser utilizados apenas como linha de orientação. Os resultados obtidos pelo seu laboratório podem ser diferentes.

São fornecidos intervalos para o controlo de qualidade. Os valores de controlo destinam-se a verificar a validade da curva e os resultados das amostras. Cada laboratório deve definir os seus próprios parâmetros para os limites aceitáveis dos ensaios. Se os valores de controlo NÃO estiverem dentro dos limites de aceitação do seu laboratório, os resultados dos ensaios devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

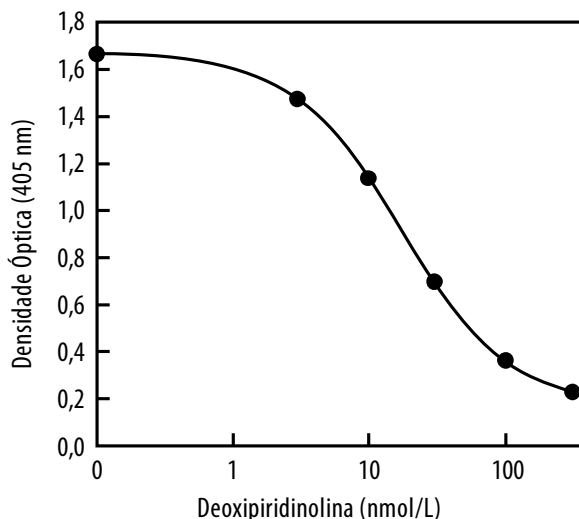
Se a densidade óptica do MicroVue DPD Standard A for inferior a 0,8, os resultados devem ser considerados questionáveis e, se possível, as amostras devem ser repetidas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos com o ensaio MicroVue DPD devem ser corrigidos para as variações na concentração urinária dividindo o valor de DPD (nmol/L) pelo valor da creatinina (mmol/L) de cada amostra (creatinina mg/dL x 0,088 = mmol/L). Os resultados finais do ensaio MicroVue DPD serão expressos como nmol DPD/mmol creatinina.

Curva padrão representativa

Níveis padrão da DPD: 0, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/L



LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Embora o ensaio MicroVue DPD seja utilizado como um indicador da reabsorção óssea, a utilização deste teste não foi estabelecida para previsão do desenvolvimento de osteoporose ou do risco de fracturas futuras. A utilização deste teste não foi estabelecida no hiperparatireoidismo ou hipertireoidismo. Quando se utiliza o ensaio MicroVue DPD para monitorização da terapêutica, os resultados poderão ser confundidos nos doentes que sofrem de outros problemas clínicos que afectam a reabsorção óssea, por exemplo, metástases ósseas, além das doenças e dos problemas indicados acima. Os resultados do ensaio MicroVue DPD devem ser interpretados em conjunto com as evidências clínicas e outros resultados de diagnóstico, não devendo ser utilizados como único determinante para iniciar ou alterar a terapêutica.

VALORES DA AMOSTRA

Os limites de referência do ensaio MicroVue DPD foram estabelecidos para homens saudáveis (n = 121) e mulheres saudáveis pré-menopausa (n = 312) com mais de 25 anos de idade. Para efeitos do estabelecimento dos intervalos de referência, os participantes saudáveis foram definidos como:

- Basicamente saudáveis, sem distúrbios ósseos, endócrinos ou crónicos
- Ciclos menstruais regulares (mulheres)
- Nem grávidas nem em fase de aleitamento (mulheres)
- Sem estarem actualmente a tomar qualquer medicação conhecida por influenciar o metabolismo ósseo (por exemplo, corticosteróides, análogos de GnRH, anticonvulsivantes, heparina, medicação para a tiróide)

Os valores podem ser influenciados por factores como a baixa produção de estrogénio, baixa ingestão de cálcio, actividade física reduzida ou doenças conhecidas por afectarem o metabolismo ósseo como, por exemplo, a osteoporose, a doença de Paget, o hiperparatiroidismo, o hipertiroidismo e as metástases ósseas. A deficiência de estrogénio nas mulheres após a menopausa pode ter como resultado uma reabsorção óssea aumentada. Sugere-se que os limites de referência pré-menopausa sejam utilizados para interpretar os resultados nas mulheres após a menopausa. Cada laboratório deve definir os seus próprios limites de referência normais. Os limites são expressos como intervalos de referência não paramétricos (IC de 90%).

	Idade (anos)	Média (nmol DPD/mmol Cr)	DP	Intervalo
Mulheres	25 - 44	5,0	1,4	3,0 - 7,4
Homens	25 - 55	3,8	1,0	2,3 - 5,4

A variabilidade prevista dentro dos participantes foi determinada a partir de amostras de urina de 49 participantes saudáveis colhidas durante cinco dias não consecutivos ao longo de duas semanas. A média da variação longitudinal individual dentro dos participantes foi de 15,5%. A variabilidade entre participantes está reflectida nos intervalos de referência não paramétricos indicados acima.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Especificidade do anticorpo

O anticorpo monoclonal anti-DPD tem uma elevada afinidade selectiva pela DPD livre e uma ligação negligenciável aos péptidos de DPD e à piridinolina (PYD) livre ou ligada a péptidos.

	% Reactividade
DPD livre	100%
PYD livre	< 1%
Péptidos de PYD/DPD	
≥ 1000 MW	< 2,5%
≥ 3500 MW	< 2,5%

Sensibilidade

O limite de detecção mínimo do ensaio MicroVue DPD é 1,1 nmol/L, determinado pelo limite superior de 3 DP num estudo de padrão zero.

Recuperação – Recuperação por fortificação

A recuperação por fortificação foi determinada adicionando uma quantidade conhecida de DPD purificada a amostras de urina com diferentes níveis de DPD endógena. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

Amostra	Endógena (nmol/L)	Adicionada (nmol/L)	Observada (nmol/L)	Recuperação (%)
1	3,1	27,3	32,0	106
2	11,2	27,3	38,8	101
3	18,2	27,3	44,9	98

Recuperação – Linearidade

A linearidade foi determinada diluindo amostras em série e comparando os valores observados com os valores esperados. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

Amostra	Factor de diluição	Observado (nmol/L)	Esperado (nmol/L)	Recuperação (%)
1	razão	65,5	-	-
	1:2	31,8	32,8	97
	1:4	15,4	16,4	94
2	razão	84,6	-	-
	1:2	39,3	42,3	93
	1:4	19,4	21,1	92
3	razão	132,6	-	-
	1:2	65,6	66,3	99
	1:4	30,2	33,2	91
	1:8	16,8	16,6	101

Precisão

A precisão intra ensaios foi determinada para ≥ 21 réplicas de 3 amostras em 2 placas de cada 3 lotes de kits (6 placas no total). A precisão entre ensaios foi determinada para ensaio de 3 amostras em 9 placas separadas de cada 3 lotes de kits (27 placas no total). As amostras indicadas a seguir representam uma gama de valores de nmol/L. Para uma mulher com uma creatinina de 4.5 mmol/L, as amostras 1 a 3 representam uma reabsorção normal baixa, normal elevada e aumentada (2.4 nmol/mmol, 6.7 nmol/mmol e 38.8 nmol/mmol, respectivamente).

Amostra	DPD (nmol/L DPD)	Intra ensaios ¹ CV%	Entre ensaios 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 ensaios

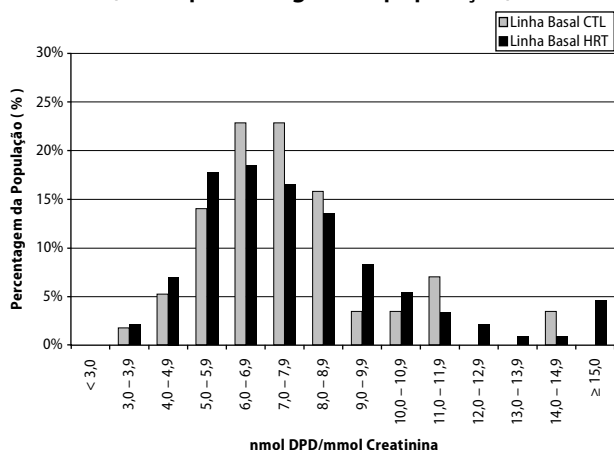
ESTUDOS CLÍNICOS

Utilização do ensaio MicroVue DPD para monitorização da terapêutica hormonal anti-reabsorção em mulheres depois da menopausa

Foi realizado com sucesso um estudo controlado, randomizado e multicêntrico para estabelecer a segurança e a eficácia do ensaio MicroVue DPD para monitorizar as alterações na excreção urinária de DPD associada à terapêutica anti-reabsorção com estrogénio/progestina. O aumento da reabsorção óssea e a perda significativa de osso estão frequentemente associados à deficiência de estrogénio depois da menopausa. Foi demonstrado que a substituição do estrogénio reduz eficazmente a reabsorção e protege a massa óssea existente.⁷⁻¹⁰ As participantes eram mulheres depois da menopausa, com idades compreendidas entre os 45 e os 64 anos (média 56 ± 4 anos), que tinham atingido a menopausa natural ou cirúrgica nos últimos 10 anos. Na linha basal, as participantes elegíveis foram randomizadas para um grupo de tratamento activo (terapêutica hormonal de substituição ou THS): Premarin® (0,625 mg por dia) com progestina placebo, Premarin (0,625 mg por dia) e uma progestina activa (Provera® 2,5 mg/dia contínua, Provera 10 mg/dia cíclica ou progesterona micronizada 200 mg/dia cíclica); ou para o grupo de controlo (CTL): estrogénio placebo e progestina placebo. Foram obtidas amostras da primeira ou da segunda urina da manhã de todas as participantes na linha basal e aos 12 meses. Os resultados do ensaio MicroVue DPD foram corrigidos para a "clearance" de creatinina e expressos como nmol DPD/mmol creatinina.

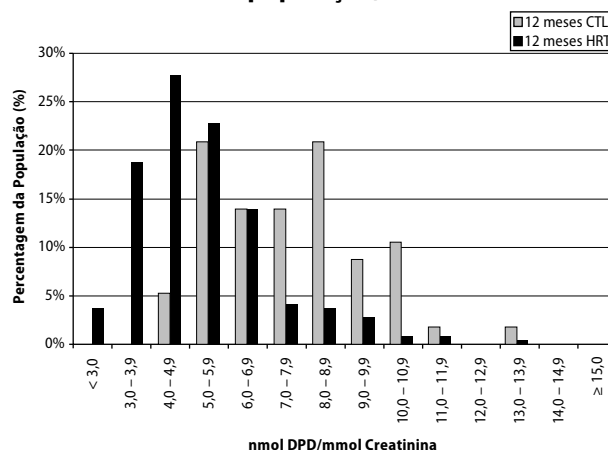
A concentração média (± 1 DP) de DPD na linha basal ($7,56 \pm 2,27$ vs. $7,94 \pm 3,25$ nmol/mmol, $p = 0,304$) e a densidade mineral óssea (BMD) da coluna lombar ($0,97 \pm 0,17$ vs. $0,97 \pm 0,15$ g/cm², $p = 0,792$) foram semelhantes para o CTL e a THS. As distribuições dos valores da DPD na linha basal na THS e no CTL estão ilustradas na Figura 1, por proporção da população do estudo.

Figura 1: Distribuição dos níveis de DPD na linha basal (como percentagem da população)



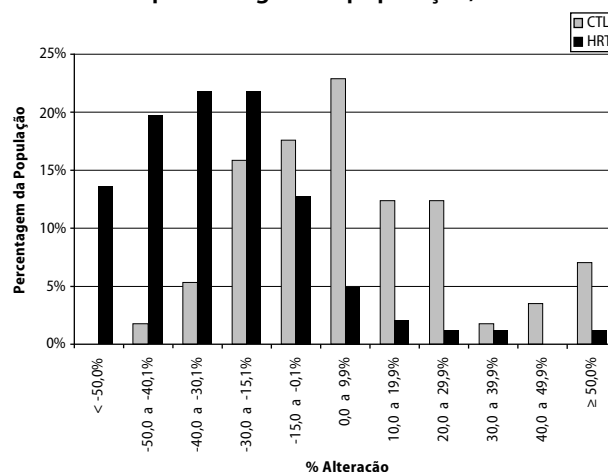
A DPD foi significativamente menor na THS do que no CTL ao fim de 12 meses ($5,27 \pm 1,78$ vs. $8,08 \pm 3,63$ nmol/mmol, $p < 0,00001$). Aos 12 meses, as participantes da THS demonstravam maior probabilidade do que as do CTL de ter uma concentração de DPD $\leq 7,4$ nmol/mmol (89% vs. 51%, $p < 0,00001$), embora as percentagens na linha basal fossem semelhantes para os 2 grupos (CTL 56%, THS 53%, $\leq 7,4$ nmol/mmol). As distribuições dos valores da DPD ao fim de 12 meses nos grupos de THS e de CTL estão ilustradas na Figura 2.

Figura 2: Distribuição dos níveis de DPD ao fim de 12 meses de terapêutica com estrogénio/progestina (THS) ou placebo (CTL) (como percentagem da população)



A concentração média (± 1 DP) de DPD nas participantes do CTL aumentou ligeiramente da linha basal para +11,7% ($\pm 49,7\%$) aos 12 meses ($p = 0,278$), enquanto as concentrações de DPD nas participantes da THS diminuíram da linha basal para -29,1 ($\pm 23,8\%$) aos 12 meses ($p < 0,00001$). As distribuições da alteração percentual em relação à linha basal nos valores da DPD ao fim de 12 meses nos grupos de THS e de CTL estão ilustradas na Figura 3.

Figura 3: Distribuição da alteração percentual dos níveis de DPD ao fim de 12 meses de terapêutica com estrogénio/progestina (THS) ou placebo (CTL) (como percentagem da população)



Ao fim de 12 meses, as participantes da THS tinham ganho densidade mineral óssea (BMD) da coluna lombar em comparação com as do CTL ($p < 0,00001$), conforme indicado no Quadro 1.

Quadro 1. Alterações na BMD da coluna lombar (média ± DP)

	n	Linha basal (g/cm ²)	12 meses (g/cm ²)	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

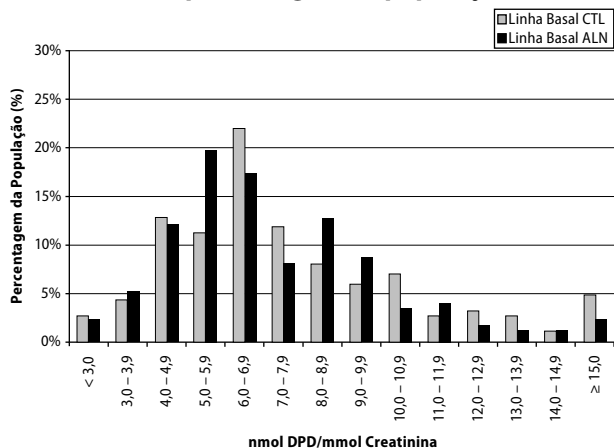
Estes resultados indicam que o ensaio MicroVue DPD é seguro e eficaz na monitorização do efeito anti-reabsorção da terapêutica hormonal de substituição (THS) nas mulheres depois da menopausa.

Utilização do ensaio MicroVue DPD para monitorização da terapêutica anti-reabsorção com bifosfonatos na osteoporose

Foi realizado com sucesso um estudo controlado, randomizado e multicêntrico para estabelecer a segurança e a eficácia do ensaio MicroVue DPD para monitorizar as alterações na excreção urinária de DPD associadas à terapêutica anti-reabsorção com amino-bifosfonato (alendronato). As participantes eram mulheres depois da menopausa, com idades compreendidas entre os 45 e os 84 anos (média 64 ± 7 anos), diagnosticadas com osteoporose (com base na apresentação clínica ou na densidade mineral óssea na coluna lombar na linha basal com mais de 2,5 desvios padrão abaixo da média para mulheres maduras antes da menopausa). Na linha basal, as participantes elegíveis foram randomizadas para receberem 10 mg de alendronato e 500 mg de cálcio por dia (ALN) ou 500 mg de cálcio por dia (CTL). Foram obtidas amostras da segunda urina da manhã de todas as participantes na linha basal e aos 3, 6 e 12 meses. Os resultados do ensaio MicroVue DPD foram corrigidos para a "clearance" de creatinina e expressos como nmol DPD/mmol creatinina.

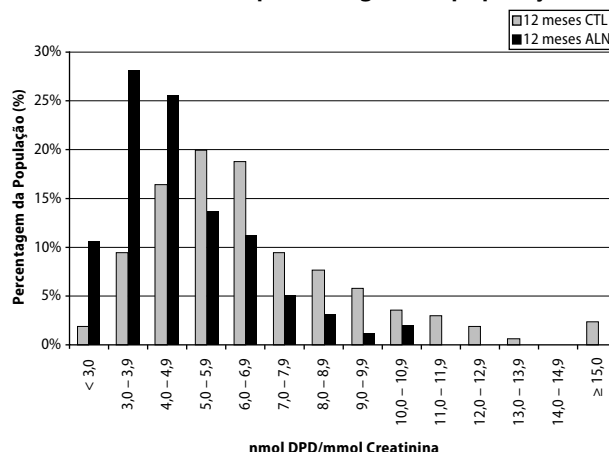
A concentração média (± 1 DP) de DPD na linha basal (7,35 ± 3,30 vs. 7,74 ± 3,47 nmol/mmol, $p = 0,278$) e a densidade mineral óssea (BMD) da coluna lombar (0,75 ± 0,09 vs. 0,74 ± 0,10 g/cm², $p = 0,426$) foram semelhantes para o ALN e o CTL. As distribuições dos valores da DPD na linha basal no ALN e no CTL estão ilustradas na Figura 4, por proporção da população do estudo.

Figura 4: Distribuição dos níveis de DPD na linha basal (como percentagem da população)



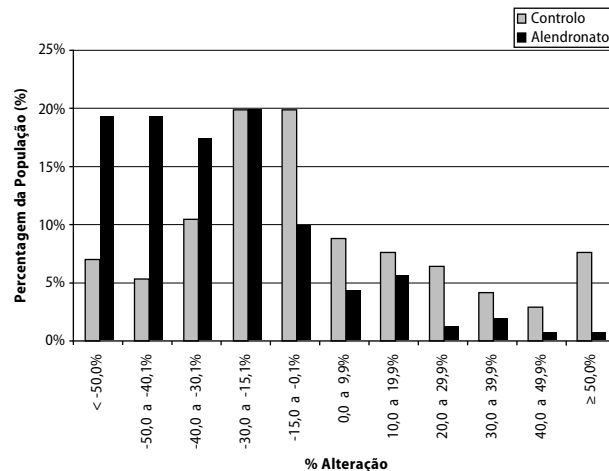
A DPD foi significativamente menor para o ALN do que para o CTL ao fim de 3 (5,45 ± 2,61 vs. 7,56 ± 3,08 nmol/mmol, $p < 0,00001$), 6 (4,83 ± 1,94 vs. 7,09 ± 3,33 nmol/mmol, $p < 0,00001$) e 12 meses (4,78 ± 1,75 vs. 6,73 ± 2,98 nmol/mmol, $p < 0,00001$). Ao fim de 3, 6 e 12 meses, 84, 89 e 91%, respectivamente, das participantes do ALN apresentavam uma concentração de DPD ≤ 7,4 nmol/mmol. As participantes do ALN tinham mais probabilidades do que as do CTL de ter uma concentração de DPD ≤ 7,4 nmol/mmol em todos os períodos de tempo ($p = 0,002$) muito embora as percentagens na linha basal fossem semelhantes para os 2 grupos (CTL 60,4%, ALN 57,8%, ≤ 7,4 nmol/mmol, respectivamente). As distribuições dos valores da DPD ao fim de 12 meses nos grupos de ALN e de CTL estão ilustradas na Figura 5.

Figura 5: Distribuição dos níveis de DPD ao fim de 12 meses de terapêutica com alendronato (ALN) ou cálcio (CTL) (como percentagem da população)



A concentração média (± 1 DP) de DPD nas participantes do CTL diminuiu gradualmente da linha basal para -4,9% (± 34,9%) aos 12 meses ($p = 0,003$), o que pode reflectir o efeito modesto do cálcio na conservação do osso.¹⁵ As concentrações médias de DPD das participantes do ALN diminuíram 22,9 ± 37,4% aos 3 meses, 28,6 ± 25,8% aos 6 meses e 29,5 ± 26,7% aos 12 meses. As distribuições da alteração percentual em relação à linha basal nos valores da DPD ao fim de 12 meses nos grupos de ALN e de CTL estão ilustradas na Figura 6.

Figura 6: Distribuição da alteração percentual dos níveis de DPD ao fim de 12 meses de terapêutica com alendronato (ALN) ou cálcio (CTL) (como percentagem da população)



Após 12 meses, os participantes do ALN tinham ganho densidade mineral óssea (BMD) da coluna lombar em comparação com as do CTL ($p < 0,00001$), conforme indicado no Quadro 2.

Table 2. Changes in Lumbar Spine BMD (Mean \pm SD)

	n	Linha basal (g/cm ²)	12 meses (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

Estes resultados indicam que o ensaio MicroVue DPD é seguro e eficaz na monitorização do efeito anti-reabsorção da terapêutica com amino-bifosfonato (alendronato) entre as participantes diagnosticadas com osteoporose.

Estudos adicionais

Foram realizados estudos clínicos para avaliar os níveis urinários de desoxipiridinolina obtidos utilizando o ensaio MicroVue DPD relacionados com níveis obtidos por análise de cromatografia líquida de alta performance (HPLC)¹⁴ e diagnóstico clínico.

O primeiro destes estudos foi realizado em centros de investigação clínica utilizando 54 amostras de voluntários saudáveis e 140 amostras de doentes com distúrbios ósseos conhecidos (incluindo osteoporose, doença de Paget, hiperparatiroidismo e hipertireoidismo). Estas doenças envolvem com frequência o aumento da reabsorção óssea e este grupo de participantes foi considerado como uma população de risco. No entanto, não se esperava que todos os participantes tivessem uma reabsorção óssea elevada na altura da colheita das amostras. Cento e três dos 140 doentes diagnosticados com um distúrbio não manifestaram valores aumentados de piridinolina conforme medida por HPLC. Os valores da desoxipiridinolina no ensaio MicroVue DPD em participantes saudáveis variaram de 2,3 a 11,2 nmol/mmol e nos doentes variaram de 1,2 a 37,3 nmol/mmol.

No estudo, o ensaio MicroVue DPD foi comparado com um método de investigação de HPLC¹⁴ para medição da piridinolina. O limite de HPLC foi determinado, num estudo de 84 participantes saudáveis, como sendo 50 nmol/mmol para os homens e 60 nmol/mmol para as mulheres (limite superior do intervalo de confiança de 95% para cada sexo). Utilizando uma piridinolina aumentada determinada por HPLC como método de classificação, recorreu-se à técnica ROC (característica operacional do receptor) para definir uma sensibilidade relativa ótima e uma especificidade na população descrita. A sensibilidade relativa e a especificidade são apresentadas no Quadro 3. Na Figura 7 apresenta-se um quadro de contingência de dois por dois indicando o número de participantes em cada classificação.

Quadro 3

MicroVue DPD	
Sensibilidade relativa	69 %
Especificidade	87 %

Figura 7

		HPLC Elevado +	PYD Não elevado -
MicroVue DPD	+	31	20
	-	14	129

No segundo estudo, os resultados do ensaio MicroVue DPD foram comparados numa população mista de 39 amostras de participantes saudáveis e 69 amostras de doentes com doença de Paget. Embora a doença de Paget represente um modelo de identificação da reabsorção óssea activa, alguns dos doentes que participaram neste estudo estavam em tratamento ou podem ter sido considerados em remissão, e podem não ter tido uma reabsorção óssea aumentada na altura da colheita das amostras. Neste estudo, os participantes saudáveis variaram de 2,3 a 6,4 nmol/mmol. Os doentes com doença de Paget variaram de 1,7 a 50,4 nmol/mmol. Utilizando o diagnóstico da doença de Paget como método de classificação, recorreu-se à técnica ROC (característica operacional do receptor) para definir uma sensibilidade relativa ótima e uma especificidade nesta população. A sensibilidade relativa e a especificidade são apresentadas no Quadro 4. Na Figura 8 apresenta-se um quadro de contingência de dois por dois.

Quadro 4

MicroVue DPD	
Sensibilidade relativa	91 %
Especificidade	97 %

Figura 8

		Diagnóstico de Paget	
		Sim	Não
MicroVue DPD	+	63	1
	-	6	38

ASSISTÊNCIA

Para serviços fora dos EUA, contacte o seu distribuidor local. A informações adicionais sobre Quidel, nossos produtos, e nossos distribuidores pode ser encontrada em nosso web site em www.quidel.com.

Abrangido pelas Patentes EUA N° 5,620,861, 5,700, 694, 6,121, 002, e 5,283,197.

REFERÊNCIAS

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.

GLOSSÁRIO



Consulte as instruções de utilização no CDROM



Finalidade

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

 **QUIDEL**[®]
CORPORATION
SPECIALTY PRODUCTS
RESEARCH TO RAPIDS[™]

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



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany