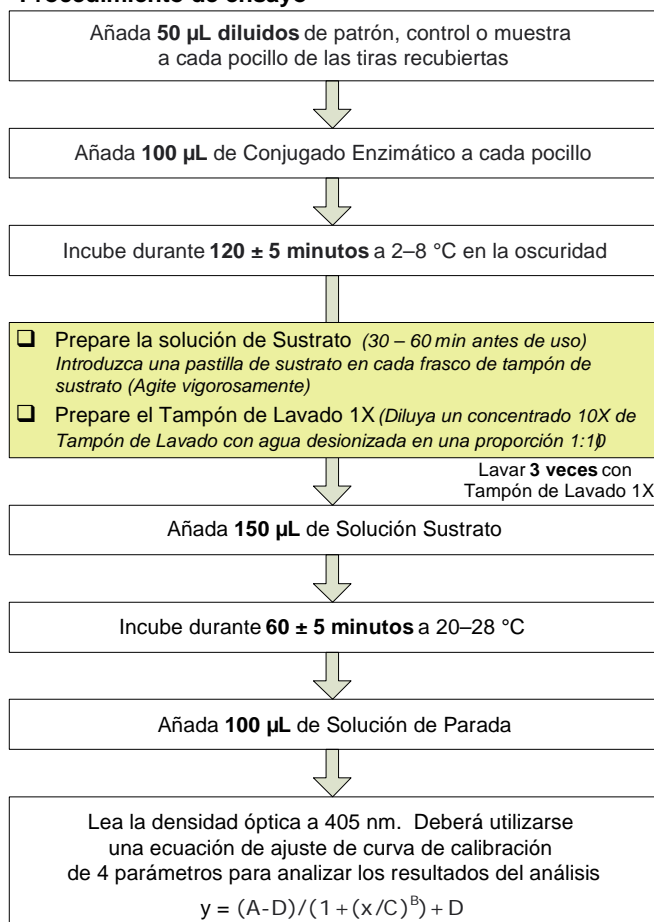


MicroVue™ DPD EIA Resumen

Preparación el Reactivo y de la Muestra

- Prepare el Conjugado Enzimático con Tampón de Análisis; le conservar à 2 à 8 °C. (7 mL de Tampón de Análisis fría para cada vial de Conjugado Enzimático.)
- Diluya las Muestras, los Patrones y los Controles en una proporción 1:10 con Tampón de Análisis (por ej. 50 µl de Muestra + 450 µL de Tampón de Análisis)

Procedimiento de ensayo



RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Aproximadamente el 90% de la matriz orgánica de los huesos está constituida por colágeno de tipo I, una proteína helicoidal triple.¹ El colágeno de tipo I de los huesos forma enlaces cruzados con moléculas específicas que proporcionan rigidez y fuerza. El colágeno de tipo I óseo maduro forma enlaces cruzados con piridinio, piridinolina (PYD) y la deoxipiridinolina (DPD).^{1,2} La DPD se forma mediante la acción enzimática de la lisiloxidasas sobre el aminoácido lisina.³ La DPD se libera a la circulación durante el proceso de reabsorción ósea,^{2,5} se excreta sin metabolizar en la orina y no se ve afectada por la dieta,⁶ lo que la hace adecuada para evaluar la reabsorción.

El hueso experimenta un proceso metabólico constante denominado remodelación.^{2,7} La remodelación consiste en un proceso de degradación, la reabsorción ósea, que está mediada por la acción de los osteoclastos, y un proceso de construcción, la formación ósea, que está mediada por la acción de los osteoblastos.^{2,7} La remodelación es necesaria para el mantenimiento y la salud general de los huesos y es un proceso estrechamente acoplado, es decir, la reabsorción y la formación se encuentran en equilibrio.⁷ En estados anómalos del metabolismo óseo, este proceso se desacopla y, cuando la reabsorción excede a la formación, provoca una pérdida neta de hueso.⁷ La determinación de productos de degradación específicos de la matriz ósea proporciona datos analíticos sobre la tasa de metabolismo óseo.^{2,4,5}

La osteoporosis es una enfermedad ósea metabólica caracterizada por una remodelación ósea anómala. Se trata de una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una baja masa ósea y un deterioro microarquitectónico del tejido óseo, con el consiguiente incremento de la posibilidad de sufrir fracturas.⁸ El tipo más habitual de osteoporosis se produce en mujeres posmenopáusicas como consecuencia de la carencia de estrógenos producida por la interrupción de la función ovárica.⁷ El restablecimiento de los niveles premenopáusicos de estrógenos mediante terapia de reposición impide la pérdida ósea y la osteoporosis.⁷⁻¹⁰ Los estrógenos y una clase de compuestos conocidos como bisfosfonatos constituyen terapias antirreabsortivas que pueden utilizarse para evitar la pérdida ósea o tratar la osteoporosis.⁷⁻¹² Esta última también puede ser consecuencia de alcanzar una masa ósea máxima inadecuada durante los años de crecimiento, un desequilibrio de la remodelación ósea con un exceso neto de la reabsorción, relacionado con la edad y una serie de dolencias clínicas y terapias inductoras de pérdida ósea o desequilibrios de la remodelación ósea.⁷ Entre estas últimas se cuentan enfermedades endocrinas, como el hipogonadismo, el hipertiroidismo, el hiperparatiroidismo y el hipercortisolismo, insuficiencia renal, cánceres con metástasis óseas; enfermedades gastrointestinales relacionadas con el metabolismo nutricional y mineral, enfermedades del tejido conjuntivo, mieloma múltiple,

USO PREVISTO

MicroVue DPD es un análisis de orina que permite una determinación cuantitativa de la excreción de enlaces cruzados de deoxipiridinolina (DPD) como indicador de la reabsorción ósea. Niveles elevados de PDP urinaria indican una alta reabsorción ósea en las personas. La determinación de la DPD está pensada como ayuda en el control de los cambios de reabsorción ósea en mujeres posmenopáusicas que reciben terapias antirreabsortivas hormonales o con bisfosfonato y en personas diagnosticadas de osteoporosis.

inmovilización crónica, alcoholismo, tabaquismo y terapia crónica con heparina o corticoesteroides.⁷ Otras enfermedades caracterizadas por remodelación ósea anómala son la enfermedad de Paget y las metástasis óseas.³

Para el análisis MicroVue DPD, se empleó tecnología de anticuerpos con el fin de producir un anticuerpo monoclonal que demostrara su especificidad para DPD.¹³ La especificidad del anticuerpo monoclonal utilizado en el análisis MicroVue DPD permite una cuantificación sencilla, cómoda, reproducible y directa de la DPD en la orina.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El análisis MicroVue DPD es un enzimoimmunoanálisis competitivo en formato de pocillos en tiras de microtitulación en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal anti-DPD recubierto en la tira para capturar la DPD. La DPD de la muestra compete con el conjugado de DPD-fosfatasa alcalina por el anticuerpo y la reacción se detecta con un sustrato pNPP. Los resultados del análisis MicroVue DPD se corrigen para la concentración urinaria mediante creatinina.

REACTIVOS Y MATERIALES PROPORCIONADOS

96 análisis para enlaces cruzados de deoxipiridinolina

El kit MicroVue DPD EIA contiene lo siguiente:

A			
B	Patrones de DPD A - F	Refs. 4203 a 4208	0,3 ml cada uno
C	(A = 0, B = 3, C = 10, D = 30, E = 100, F = 300 nmol/L DPD)		
D	DPD purificada de hueso de bovino en 10 mmol/L de ácido fosfórico con azida sódica (0,05%) como conservante		
E			
F			
L	Controles bajo/alto	Refs. 4209, 4210	0,3 ml cada uno
H	DPD purificada de hueso de bovino en 10 mmol/L de ácido fosfórico con azida sódica (0,05%) como conservante		
1	Tiras recubiertas	Ref. 4661	12 cada uno
	Anticuerpo anti-DPD monoclonal de ratón purificado adsorbido en pocillos en tiras		
2	Solución de parada	Ref. 4702	15 mL
	NaOH 0,5N		
3	Tampón de lavado 10X	Ref. 4703	55 mL
	Detergente no iónico en una solución tamponada que contiene azida sódica (0,05%) como conservante		
4	Tampón de análisis	Ref. 4704	55 mL
	Detergente no iónico en una solución tamponada que contiene azida sódica (0,05%) como conservante		
5	Tampón del sustrato	Ref. 4705	3 x 10 mL
	Una solución de dietanolamina y cloruro de magnesio que contiene azida sódica (0,05%) como conservante		
6	Pastillas de sustrato	Ref. 0012	3 x 20 mg
	Fosfato de p-nitrofenil		
7	Conjugado enzimático	Ref. 4202	3 cada uno
	DPD liofilizada, purificada de hueso de bovino, conjugada con fosfatasa alcalina que contiene sales amortiguadoras y estabilizantes		
	Tapa de la placa	Ref. 0047	3 cada una

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

- Micropipetas de 50–300 µL
- Material adecuado para medir 7–300 mL de líquidos
- Recipiente para dilución del tampón de lavado
- Probetas para la dilución de muestras, patrones y controles
- Agua desionizada o destilada
- Lector de placas capaz de leer a 405 nm
- Software de ajuste de curva de calibración de 4 parámetros
- Valores de creatinina (mmol/L) para muestras de orina

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso Diagnóstico *in vitro*.
2. Trate todas las muestras como material potencialmente biopeligroso. Respete las precauciones universales al manipular el contenido de este kit y las muestras de los pacientes.
3. Deseche los recipientes y el contenido no utilizado de acuerdo con la normativa internacional, nacional y local.
4. Use los reactivos suministrados como una unidad integral antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
5. Use ropa protectora adecuada, guantes y protección ocular/facial al manipular el contenido de este kit.
6. Almacene los reactivos de análisis según lo indicado.
7. No emplee las tiras recubiertas si la bolsa está pinchada.
8. Analice cada muestra por duplicado.
9. El NaOH 0,5N se considera corrosivo y puede provocar quemaduras graves. No lo ingiera. Evite el contacto con la piel, los ojos y la ropa. En caso de contacto, lave con agua. En caso de ingestión, solicite asistencia médica.
10. La azida sódica se utiliza como conservante. El contacto o la ingestión accidentales de tampones que contienen azida sódica pueden provocar irritación en la piel, los ojos o la boca. Emplee únicamente los tampones para los fines previstos y evite el contacto con ácidos. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Después de desecharlo, enjuague con agua abundante para evitar la acumulación de la azida.
11. El tampón de sustrato contiene dietanolamina y puede causar irritación en los ojos y en la piel con el contacto prolongado. Use ropa protectora adecuada, guantes y protección ocular/facial. Las áreas que entren en contacto con el tampón deben lavarse de inmediato con agua y jabón.
12. Los patrones y controles están en de ácido fosfórico 10 mmol/L. Evite el contacto con la piel, los ojos y la ropa. No lo ingiera. En caso de contacto, lave con agua. En caso de ingestión, solicite asistencia médica.
13. Se recomienda utilizar pipetas multicanal o pipeteros de repetición para garantizar una administración oportuna de los reactivos.
14. Para una medición exacta de las muestras, añada las muestras y los patrones con precisión. Pipetee cuidadosamente utilizando sólo equipo calibrado.

15. Diluya las muestras superiores a 300 nmol/L en tampón de análisis y repita la prueba. Incluya el factor de dilución en el cálculo final.
16. Este análisis puede realizarse con cualquier método de lavado homologado.
17. Los patrones de deoxipiridinolina, los controles y el conjugado enzimático son sensibles a la luz. Evite la exposición prolongada a la luz, especialmente a la luz solar directa o indirecta. Almacene los reactivos en la oscuridad cuando no los utilice. Las muestras y los reactivos no se ven afectados de forma significativa por la luz artificial normal del laboratorio cuando se manipulan según lo indicado en Procedimiento de análisis.
18. Si no pudiera mantenerse la temperatura ambiente entre 20 y 28°C y no fuera compatible una absorbancia > 2,0 con el lector de placas, controle el desarrollo del sustrato en los pocillos de patrón A; detenga la reacción cuando la densidad óptica alcance 1,2–1,5 y luego lea las tiras.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tampón de lavado - Véase la nota del procedimiento en la sección **PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS**

Prepare la cantidad necesaria de tampón de lavado 1X (véase la tabla de PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS) diluyendo un concentrado 10X de tampón de lavado con agua desionizada en una proporción 1:10. Guárdelo a 20–28 °C. Utilice el tampón de lavado 1X en las 21 días siguientes a su preparación.

Instrucciones especiales de lavado: Prepare el tampón de lavado 1X según se indica anteriormente y almacene a 2–8 °C hasta su uso.

Conjugado enzimático

Prepare el conjugado enzimático en las 2 previas a su uso. Reconstituya cada vial necesario de conjugado enzimático (véase la tabla) con 7 mL de tampón de análisis. Guarde el conjugado enzimático reconstituido a 2–8 °C hasta su uso.

Solución sustrato de trabajo

El tampón sustrato deberá ponerse a 20–28 °C antes del inicio del análisis (se recomiendan desde dos horas hasta toda la noche). Prepare la solución de sustrato de trabajo como máximo 1 hora antes de su uso. Introduzca una pastilla de sustrato en cada frasco necesario de tampón de sustrato a 20–28°C (véase la tabla). Deje disolver las pastillas durante 30 y 60 minutos. Agite vigorosamente las botellas para mezclar completamente.

ALMACENAMIENTO

Guarde el conjunto a 2–8 °C.

No congele.

Guarde los reactivos no utilizados a 2–8 °C.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El análisis MicroVue DPD puede llevarse a cabo utilizando las recogidas de orina sin conservantes de la primera micción de la mañana (First Morning Void - FMV) o de la segunda micción de la mañana (Second Morning Void - SMV). Se recomienda efectuar las recogidas antes de las 10:00 de la mañana para evitar cualquier posible influencia de la variación diurna. Para conservar la muestra de orina menos de 7 días, manténgala en la nevera a 2–8 °C; para una conservación más prolongada congélela a ≤ -20 °C. No someta la muestra a más de 5 ciclos de congelación/descongelación. Evite la exposición prolongada a la luz, especialmente a la luz solar. Durante el procesamiento sistemático, las muestras no se ven afectadas por la iluminación artificial normal del laboratorio.

Cuando se vaya a controlar el tratamiento, recoja muestras iniciales antes de iniciar el tratamiento. Para comparaciones posteriores recoja las muestras a la misma hora del día que la muestra inicial.

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

Lea todo el prospecto del producto antes de iniciar el análisis.

Vea **PREPARACIÓN DE REACTIVOS** antes de continuar.

NOTA SOBRE EL PROCEDIMIENTO: El análisis MicroVue DPD es sensible a las condiciones de lavado. La **etapa de lavado completa** paso debe completarse en **2 minutos**. Si **NO** pudiera completarse la etapa de lavado en **2 minutos**, siga las **Instrucciones especiales de lavado** que se encuentran en las secciones **PREPARACIÓN DE REACTIVOS** y Paso de lavado.

Determine la cantidad necesaria de cada reactivo para el número de tiras que se vayan a utilizar.

Nº de tiras	4	6	8	12
Nº de muestras (analizadas por duplicado)	8	16	24	40
Conjugado enzimático (vial)	1	1	2*	2*
Sustrato (frasco)	1	1	2*	2*
Tampón de lavado 1X (mL)	100	150	200	300

* Cuando se vaya a utilizar más de un frasco o vial, combine el contenido y mezcle antes de usarlo.

Incubación de la muestra/conjugado de enzimas

1. Diluya las muestras, los patrones y los controles en una proporción 1:10 con tampón de análisis (por ej. 50 µL de muestra + 450 µL de tampón de análisis).
2. Extraiga la estructura de pocillos de tiras y el número necesario de tiras recubiertas de la bolsa (véase la tabla). Asegúrese de que la bolsa que contenga las tiras no utilizadas quede perfectamente sellada.
3. Introduzca el número deseado de tiras recubiertas en la estructura de pocillos en tiras. Etiquete las tiras para evitar la mezcla en caso de extracción accidental de la estructura.
4. Añada 50 µL diluidos de patrón, control o muestra a cada pocillo de las tiras recubiertas. Este paso debe completarse en 30 minutos.

- Prepare el conjugado enzimático en las 2 previos a su uso. Reconstituya cada vial necesario de conjugado enzimático (véase la tabla) con 7 mL de tampón de análisis. Guarde el conjugado enzimático reconstituido a 2–8 °C hasta su uso.
- Añada 100 µL de conjugado enzimático reconstituido a cada pocillo. Cubra las tiras con la cubierta de cinta proporcionada. Incube durante 2 horas (± 5 minutos) a 2–8 °C. Dicha incubación debe efectuarse en la oscuridad.
- Prepare la solución de sustrato de trabajo como máximo 1 hora antes de su uso. Introduzca una pastilla de sustrato en cada frasco necesario de tampón de sustrato a 20–28 °C (véase la tabla). Deje disolver las pastillas durante 30 y 60 minutos. Agite vigorosamente las botellas para mezclar completamente.

Paso de lavado

- Prepare la cantidad necesaria de tampón de lavado 1X (véase la tabla) diluyendo de tampón de lavado 10X con agua desionizada en una proporción 1:10. Invierta/vacíe manualmente las tiras. Añada como mínimo 250 µL de tampón de lavado 1X a cada pocillo e invierta/vacíe manualmente las tiras. Repita dos veces más hasta un total de tres lavados. Seque vigorosamente las tiras sobre toallitas de papel después del último lavado. Mientras las tiras se encuentran invertidas, limpie cuidadosamente en fondo con una toallita de papel sin pelusas para asegurarse de que queda perfectamente limpia
Instrucciones especiales de lavado: Ejecute la etapa de lavado como se ha indicado anteriormente, empleando tampón de lavado 1X frío (2–8 °C). Tras el último lavado, deje escurrir las tiras durante 5-10 minutos sobre toallitas de papel antes de añadir el sustrato.

Incubación del sustrato

- Añada 150 µL de solución sustrato de trabajo a cada pocillo.
- Incube durante 60 horas (± 5 minutos) a 20–28 °C.

Parada/lectura

- Añada 100 µL de solución de parada a cada pocillo. Añada solución de parada de la misma forma y en los mismos intervalos de tiempo que en el caso de la solución sustrato.
- Lea la densidad óptica a 405 nm. Asegúrese de que no hay burbujas grandes en los pocillos y que el fondo de las tiras está limpia. Las tiras deben leerse en los **15 minutos** siguientes a la adición de la solución de parada.
- Deberá utilizarse software de cuantificación con una ecuación de ajuste de curva de calibración de 4 parámetros para analizar los resultados del análisis MicroVue DPD.
Ecuación: $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$
- Determine la concentración de las muestras y los controles a partir de la curva estándar.
- Los valores de control deberán estar dentro del intervalo especificado en el certificado de análisis suministrado con el kit.

CONTROL DE CALIDAD

El certificado de análisis incluido en este kit es específico de lote y ha de emplearse para verificar que los resultados obtenidos por su laboratorio son similares a los obtenidos en Quidel Corporation. Se proporcionan los valores de densidad óptica, pero deberán utilizarse únicamente a efectos orientativos. Los resultados obtenidos por su laboratorio pueden ser diferentes.

Se proporcionan los intervalos de control de calidad. Los valores de control están concebidos para verificar la validez de la curva y los resultados de las muestras. Cada laboratorio debe establecer sus propios parámetros para límites de análisis aceptables. Si los valores de control NO están dentro de los límites de aceptación de su laboratorio, los resultados del análisis deben considerarse cuestionables y las muestras tendrán que repetirse.

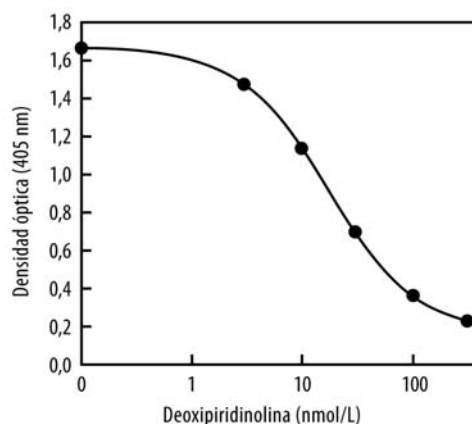
Si la densidad óptica del patrón A de MicroVue DPD es inferior a 0,8, los resultados deberán considerarse cuestionables y, si es posible, tendrán que repetirse las muestras.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Deben corregirse los resultados obtenidos en el análisis MicroVue DPD para las variaciones de la concentración de orina dividiendo el valor de DPD (nmol/L) entre el valor de creatinina (mmol/L) de cada muestra (mg/dL de creatinina x 0,088 = mmol/L). Los resultados finales de MicroVue DPD se expresarán como nmol de DPD/mmol de creatinina.

Curva representativa estándar

Niveles de patrón de DPD: 0, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/L



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Aunque el análisis MicroVue DPD se utiliza como indicador de la reabsorción ósea, no se ha establecido el uso de esta prueba para predecir el desarrollo de osteoporosis o el riesgo de fracturas futuras. No se ha establecido el uso de esta prueba en el hiperparatiroidismo o el hipertiroidismo. Cuando se utiliza MicroVue DPD para controlar el tratamiento, los resultados pueden verse confundidos en pacientes aquejados por dolencias clínicas de las que se sabe que afectan a la reabsorción ósea, por ej. metástasis óseas, además de las enfermedades y dolencias indicadas anteriormente. Los resultados de MicroVue DPD deben interpretarse junto con los resultados clínicos y otros resultados diagnósticos y no tienen que emplearse como determinante único a la hora de iniciar o cambiar un tratamiento.

VALORES DE LA MUESTRA

Se han establecido intervalos de referencia de MicroVue DPD para varones sanos (n = 121) y mujeres premenopáusicas sanas (n = 312) mayores de 25 años. A efectos de establecer los intervalos de referencia, las personas sanas se definieron como:

- Básicamente sanos, sin trastornos óseos, endocrinos ni crónicos
- Ciclos menstruales regulares (mujeres)
- Sin embarazo ni en período de lactancia (mujeres)
- Que no estén tomando en la actualidad ninguna medicación que afecte al metabolismo óseo (por ej. corticoesteroides, análogos de GnRH, anticonvulsivos, heparina, medicación para el tiroides).

Los valores pueden verse influidos por factores como una baja producción de estrógenos, una escasa ingesta de calcio, poca actividad física o enfermedades que afecten al metabolismo óseo, como la osteoporosis, la enfermedad de Paget, el hiperparatiroidismo, el hipertiroidismo y las metástasis óseas. La deficiencia de estrógenos en mujeres posmenopáusicas puede provocar una mayor reabsorción ósea. Se sugiere utilizar el intervalo de referencia premenopáusico para interpretar los resultados en las mujeres posmenopáusicas. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal. Los intervalos se expresan como intervalos de referencia no paramétricos (IC del 90%).

	Edad (años)	Media (nmol de DPD/mmol de Cr)	DE	Intervalo
Mujeres	25 - 44	5,0	1,4	3,0 - 7,4
Varones	25 - 55	3,8	1,0	2,3 - 5,4

La variabilidad esperada en un mismo paciente se determinó a partir de muestras de orina de 49 personas sanas recogidas durante cinco días no consecutivos a lo largo de dos semanas. El promedio de la variación longitudinal individual en una misma persona fue del 15,5%. La variabilidad entre pacientes se refleja en los intervalos de referencia no paramétricos mostrados anteriormente.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Especificidad del anticuerpo

El anticuerpo monoclonal anti-DPD presenta una afinidad selectiva y muy elevada por la DPD libre y una unión insignificante a los péptidos de DPD y a la piridinolina (PYD) libre o unida a péptidos.

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

Sensibilidad

El límite de detección mínimo del análisis MicroVue DPD es de 1,1 nmol/L, determinado por el límite superior de 3 DE en un estudio de patrón cero.

Recuperación - Recuperación de concentración máxima

La recuperación de las concentraciones máximas se determinó añadiendo una cantidad conocida de DPD purificada a muestras de orina con diferentes niveles de DPD endógena. A continuación se muestran los resultados típicos

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

Recuperación - Linealidad

La linealidad se determinó diluyendo en serie las muestras y comparando los valores observados con los valores esperados. A continuación se muestran los resultados típicos.

Muestra	Factor de dilución	Observada (nmol/L)	Esperada (nmol/L)	Recuperación (%)
1	pura	65,5	-	-
	1:2	31,8	32,8	97
	1:4	15,4	16,4	94
2	pura	84,6	-	-
	1:2	39,3	42,3	93
	1:4	19,4	21,1	92
3	pura	132,6	-	-
	1:2	65,6	66,3	99
	1:4	30,2	33,2	91
	1:8	16,8	16,6	101

Precisión

La precisión intra-análisis se determinó analizando ≥ 21 repeticiones de 3 muestras en 2 placas de cada uno de los tres lotes del kit (total, 6 placas). La precisión inter-análisis se determinó para 3 muestras analizadas en 9 placas independientes de cada uno de los tres lotes del kit (27 placas en total). Las muestras que se presentan a continuación representan un intervalo de valores de nmol/L. Para un mujer con una creatinina de 4,5 mmol/L, las muestras 1 a 3 representan una reabsorción normal baja, normal alta y elevada (2,4 nmol/mmol, 6,7 nmol/mmol y 38,8 nmol/mmol, respectivamente).

Muestra	DPD (nmol/L de DPD)	Intra-análisis ¹ VC %	Inter-análisis ² VC %
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 análisis

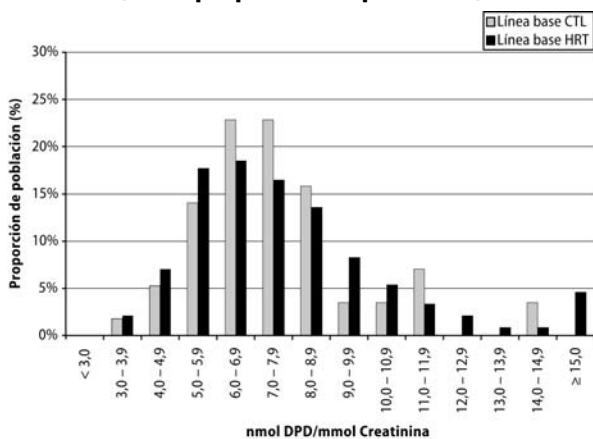
ESTUDIOS CLÍNICOS

Uso de MicroVue DPD para el control del tratamiento antirreabsortivo hormonal en mujeres posmenopáusicas.

Se llevó a cabo con éxito un ensayo aleatorizado, controlado y multicéntrico con objeto de establecer la seguridad y la eficacia del análisis MicroVue DPD para controlar los cambios de la excreción urinaria de DPD asociados con la terapia antirreabsortiva con estrógenos/progestina. El incremento de la reabsorción ósea y la pérdida significativa de hueso suelen estar asociadas con una carencia estrogénica posmenopáusica. Se ha demostrado que la reposición de estrógenos reduce con eficacia la reabsorción ósea y protege la masa ósea existente.⁷⁻¹⁰ Las pacientes eran mujeres posmenopáusicas, con una edad de 45 a 64 años (media de 56 ± 4 años), que habían experimentado menopausia natural o quirúrgica en los últimos 10 años. Al comienzo, las pacientes idóneas fueron aleatorizadas a uno de los siguientes grupos de tratamiento activo (HRT): Premarin® (0,625 mg diarios) con progestina placebo, Premarin (0,625 mg diarios) y progestina activa (Provera® 2,5 mg/día continuos, Provera 10 mg/día cíclicos o progesterona micronizada 200 mg/día cíclicos); o grupo de control (CTL): estrógeno placebo y progestina placebo. Se obtuvieron muestras de la primera y la segunda orina de la mañana al comienzo y a los 12 meses de todas las pacientes. Se corrigieron los resultados de MicroVue DPD para el aclaramiento de creatinina y se expresaron como nmol de DPD/mmol de creatinina.

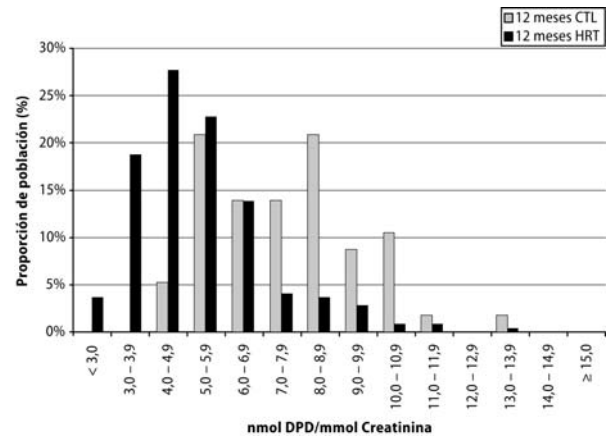
La concentración inicial media de DPD (± 1 DE) ($7,56 \pm 2,27$ frente a $7,94 \pm 3,25$ u/L; $p = 0,304$) y la densidad mineral ósea de la columna lumbar ($0,97 \pm 0,17$ frente a $0,97 \pm 0,15$ g/cm²; $p = 0,792$) presentaron valores similares para CTL y HRT. En la Figura 1 se muestran las distribuciones de los valores iniciales de DPD en el tratamiento con HRT y CTL por proporción de la población estudiada.

Figura 1: Distribución de los niveles de DPD al comienzo (como proporción de población)



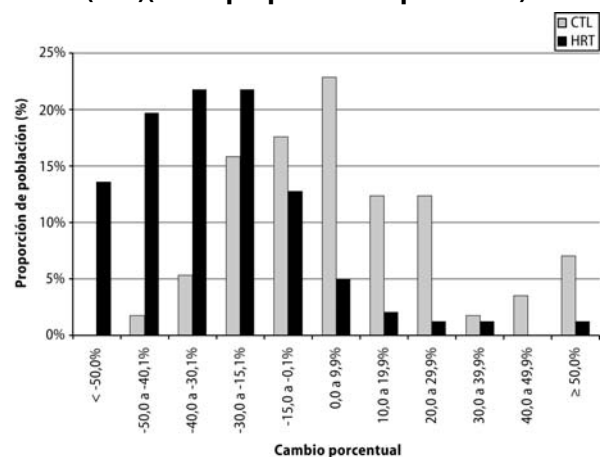
La DPD fue significativamente inferior para la HRT que para el tratamiento con CTL a los 12 meses ($5,27 \pm 1,78$ frente a $8,08 \pm 3,63$ u/L; $p < 0,00001$). A los 12 meses, las pacientes del grupo de HRT eran más propensas que las de CTL a tener una concentración de $DPD \leq 7,4$ nmol/mmol (89% frente a 51%, $p < 0,00001$) aunque las proporciones iniciales eran similares para los 2 grupos (CTL 56%, HRT 53%, $\leq 7,4$ nmol/mmol). En la Figura 2 se presentan las distribuciones de los valores de DPD al cabo de 12 meses en los grupos de HRT y CTL.

Figura 2: Distribución de los niveles de DPD después de 12 meses de tratamiento con estrógeno/progestina (HRT) o placebo (CTL)(como proporción de población)



La concentración media de DPD (± 1 DE) en pacientes tratados con CTL aumentó ligeramente desde el valor inicial hasta hasta el $+11,7\%$ ($\pm 49,7\%$) a los 12 meses ($p = 0,278$) mientras que las concentraciones de DPD en pacientes tratadas con HRT descendieron desde los valores iniciales hasta el $-29,1$ ($\pm 23,8\%$) a los 12 meses ($p < 0,0001$). En la Figura 3 se presentan las distribuciones del cambio porcentual de los valores de DPD respecto al valor inicial al cabo de 12 meses en los grupos de HRT y CTL.

Figura 3: Distribución de cambio porcentual en los niveles de DPD después de 12 meses de tratamiento con estrógeno/progestina (HRT) o placebo (CTL)(como proporción de población)



A los 12 meses, las pacientes del grupo de HRT habían ganado BMD de la columna lumbar en comparación con las de CTL ($p < 0,00001$) según se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Cambios en la BMD de la columna lumbar (media \pm DE)

	n	Inicial (g/cm ²)	12 meses (g/cm ²)	Δ (%)
CTL	57	0,97 \pm 0,17	0,95 \pm 0,17	-1,6 \pm 2,7
HRT	244	0,97 \pm 0,15	1,01 \pm 0,15	+3,7 \pm 2,7

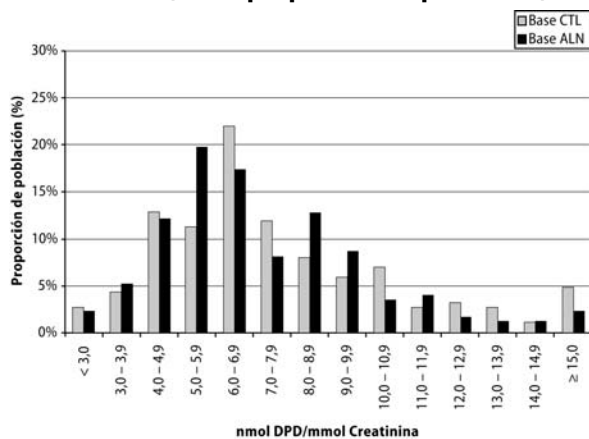
Estos resultados indican que el análisis MicroVue DPD es seguro y eficaz para controlar el efecto antirreabsortivo de la terapia de reposición hormonal en mujeres posmenopáusicas.

Uso de MicroVue DPD para el control del tratamiento antirreabsortivo con bisfosfonato en la osteoporosis

Se llevó a cabo con éxito un ensayo aleatorizado, controlado y multicéntrico con objeto de establecer la seguridad y la eficacia del análisis MicroVue DPD para controlar los cambios de la excreción urinaria de DPD asociados con la terapia antirreabsortiva de aminobisfosfonato (alendronato). Las pacientes eran mujeres posmenopáusicas con una edad de 45 a 84 años (media de 64 \pm 7 años), diagnosticadas de osteoporosis (en función de la presentación clínica o del valor de índice de masa ósea de la columna lumbar inicial superior a 2,5 desviaciones estándar por debajo de la media para mujeres premenopáusicas maduras). Al comienzo, se aleatorizaron las pacientes idóneas a recibir o bien 10 mg de alendronato y 500 mg de calcio al día (ALN) o bien 500 mg de calcio al día (CTL). Se obtuvieron muestras de la segunda orina matutina de todas las pacientes al comienzo y a los 3, 6 y 12 meses. Se corrigieron los resultados de MicroVue DPD para el aclaramiento de creatinina y se expresaron como nmol de DPD/mmol de creatinina.

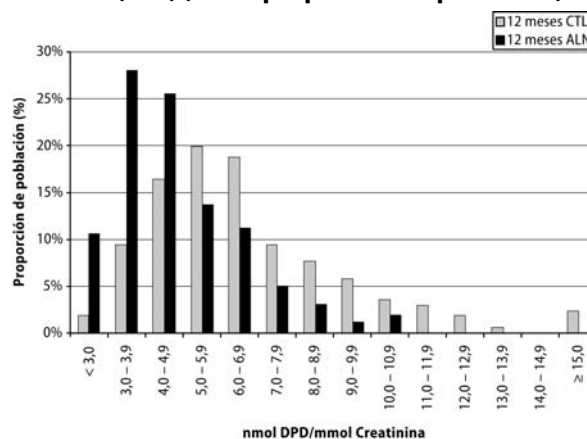
La concentración inicial media de DPD (\pm 1 DE) (7,35 \pm 3,30 frente a 7,74 \pm 3,47 nmol/mmol; $p = 0,278$) y la densidad mineral ósea de la columna lumbar (0,75 \pm 0,09 frente a 0,74 \pm 0,10 g/cm²; $p = 0,426$) presentaron valores similares para ALN y CTL. En la Figura 4 se muestran las distribuciones de los valores iniciales de DPD en el tratamiento con ALN y CTL por proporción de la población estudiada.

Figura 4: Distribución de los niveles de DPD al comienzo (como proporción de población)



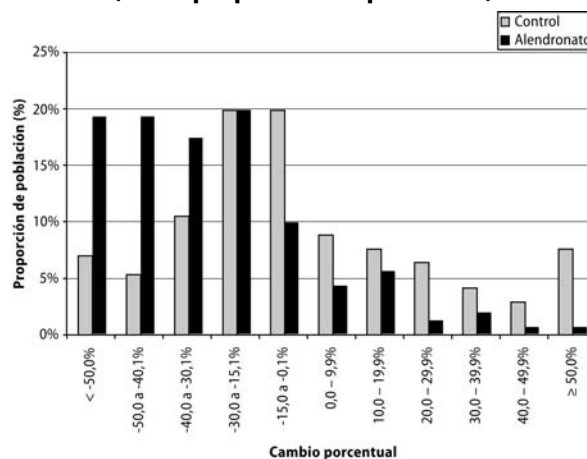
La DPD fue significativamente inferior para ALN que para CTL a los 3 (5,45 \pm 2,61 frente a 7,56 \pm 3,08 nmol/mmol, $p < 0,00001$), a los 6 (4,83 \pm 1,94 frente a 7,09 \pm 3,33 nmol/mmol, $p < 0,00001$) y a los 12 meses (4,78 \pm 1,75 frente a 6,73 \pm 2,98 nmol/mmol, $p < 0,00001$). A los 3, 6 y 12 meses, el 84, el 89 y el 91%, respectivamente, de las pacientes que recibieron ALN presentaron una concentración de DPD \leq 7,4 nmol/mmol. Las pacientes del grupo de ALN eran más propensas que las de CTL a tener una concentración de DPD \leq 7,4 nmol/mmol en todos momentos del estudio ($p < 0,002$), aunque las proporciones iniciales eran similares para los 2 grupos (CTL 60,4%, ALN 57,8%, \leq 7,4 nmol/mmol, respectivamente). En la Figura 5 se presentan las distribuciones de los valores de DPD al cabo de 12 meses en los grupos de ALN y CTL.

Figura 5: Distribución de los niveles de DPD después de 12 meses de tratamiento con alendronato (ALN) o calcio (CTL) (como proporción de población)



La concentración media de DPD (\pm 1 DE) en las pacientes tratadas con CTL se redujo gradualmente desde los valores iniciales hasta el -4,9% (\pm 34,9%) a los 12 meses ($p = 0,003$), lo que puede reflejar el modesto efecto ahorrador de hueso del calcio.¹⁵ Las concentraciones medias de DPD en las pacientes tratadas con ALN se redujeron un 22,9 \pm 37,4% a los 3 meses, un 28,6 \pm 25,8% a los 6 meses y un 29,5 \pm 26,7% a los 12 meses. En la Figura 6 se presentan las distribuciones del cambio porcentual de los valores de DPD respecto al valor inicial al cabo de 12 meses en los grupos de ALN y CTL.

Figura 6: Distribución del cambio porcentual en los niveles de DPD después de 12 meses de tratamiento con alendronato (ALN) o calcio (CTL) (como proporción de población)



A los 12 meses, las pacientes del grupo de ALN habían ganado BMD de la columna lumbar en comparación con las de CTL ($p < 0,00001$) según se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Cambios en la BMD de la columna lumbar (media \pm DE)

	n	Inicial (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

Estos resultados indican que el análisis MicroVue DPD es seguro y eficaz para el control del efecto antirreabsortivo del tratamiento con aminobisfosfonato (alendronato) entre las personas diagnosticadas de osteoporosis.

Otros estudios

Se efectuaron estudios clínicos para evaluar los niveles urinarios de deoxipiridinolina obtenidos utilizando el análisis MicroVue DPD con relación a los niveles obtenidos mediante análisis de HPLC¹⁴ y diagnósticos clínicos.

El primero de estos estudios se realizó en centros de investigación clínica utilizando 54 muestras de voluntarios sanos y 140 muestras de pacientes con trastornos óseos conocidos (entre ellos la osteoporosis, la enfermedad de Paget, el hiperparatiroidismo y el hipertiroidismo). Dichas enfermedades implican a menudo una reabsorción ósea elevada y este grupo de individuos fue considerado como población de riesgo. Sin embargo, no se esperaba que todas las personas presentaran una elevada reabsorción ósea en el momento de la recogida de muestras. Ciento tres de los 140 pacientes diagnosticados de alguna dolencia no tenían valores elevados de piridinolina según la HPLC. Los valores de deoxipiridinolina de MicroVue DPD en las personas sanas oscilaron entre 2,3 y 11,2 nmol/mmol y en los pacientes entre 1,2 y 37,3 nmol/mmol.

En el estudio, el análisis MicroVue DPD se comparó con un método de investigación de HPLC¹⁴ para medir la piridinolina. Se determinó que el umbral de HPLC era, en un estudio de 84 individuos sanos, de 50 nmol/mmol para los varones y de 60 nmol/mmol para las mujeres (límite superior del intervalo de confianza del 95% para cada sexo). Utilizando la piridinolina elevada determinada mediante HPLC como método de clasificación, se empleó la técnica de característica operativa del receptor (Receiver Operating Characteristic - ROC) para definir una sensibilidad relativa y una especificidad óptimas en la población descrita. En la tabla 3 se presentan la sensibilidad relativa y la especificidad. En la figura 7 se muestra una tabla de contingencias de dos por dos en la que se indica el número de individuos dentro de cada clasificación.

Tabla 3

MicroVue DPD

Sensibilidad relativa	69 %
Specificity	87 %

Figura 7

	HPLC Elevada	Piridinolina No elevada
MicroVue DPD +	31	20
MicroVue DPD -	14	129

En el segundo estudio, los resultados del análisis MicroVue DPD se compararon en una población mixta de 39 muestras de personas sanas y 69 muestras de pacientes con la enfermedad de Paget. Aunque la enfermedad de Paget representa un modelo para identificar la reabsorción ósea activa, algunos de los pacientes de este estudio estaban recibiendo tratamiento o pueden haber sido considerados en remisión y tal vez no presentaran una elevada reabsorción ósea en el momento de la recogida de muestras. En este estudio, las personas sanas oscilaron entre 2,3 y 6,4 nmol/mmol. Los pacientes con enfermedad de Paget oscilaron entre 1,7 y 50,4 nmol/mmol. Empleando el diagnóstico de la enfermedad de Paget como método de clasificación, se utilizó la técnica de ROC para definir una sensibilidad relativa y una especificidad óptimas en esta población. En la tabla 4 se presentan la sensibilidad relativa y la especificidad. En la figura 8 se muestra una tabla de contingencia de dos por dos.

Tabla 4

MicroVue DPD

Sensibilidad relativa	91 %
Especificidad	97 %

Figura 8

Diagnóstico de Paget

	Sí	No
MicroVue DPD +	63	1
MicroVue DPD -	6	38

ASISTENCIA

Para servicios fuera de EE.UU., póngase en contacto con su distribuidor local. Información adicional de Quidel, nuestros productos y nuestros distribuidores puede encontrarse en nuestra página web www.quidel.com.

Cubierto por los números de patentes de los EE.UU. 5,620,861, 5,700, 694, 6,121, 002, y 5,283,197.

REFERENCIAS

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.

GLOSARIO



Consulte las instrucciones de uso en CDROM



Uso Previsto

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



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



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany