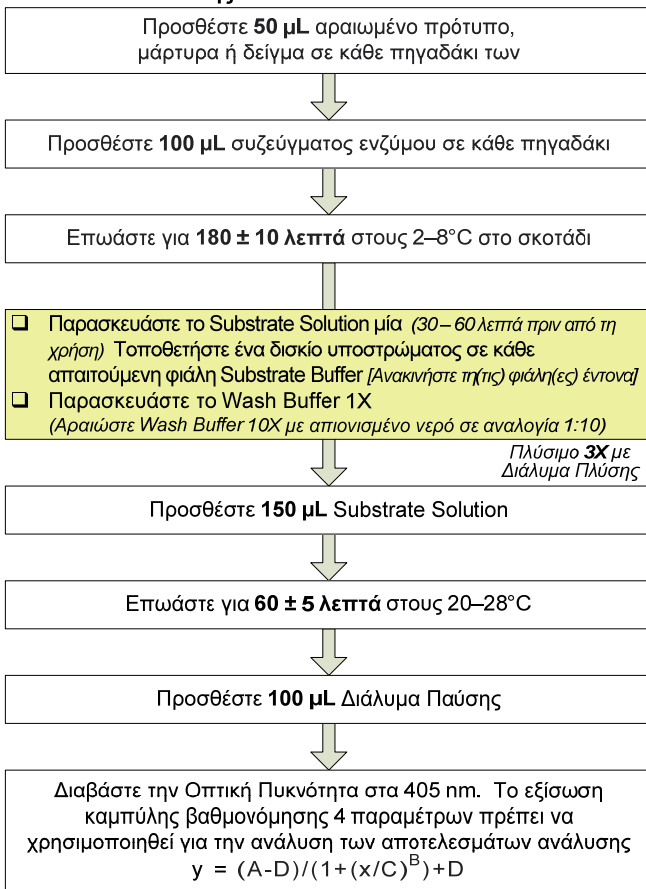


MicroVue™ PYD EIA Περίληψη

Προετοιμασία Αντιδραστηρίων Και Δειγμάτων

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

Διαδικασία Ανάλυσης



iu ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το MicroVue PYD είναι μια ουρολογική ανάλυση που προσφέρει ποσοτική μέτρηση της απέκκρισης των διασταυρώσεων πυριδινίου ως δείκτη της απορρόφησης κολλαγόνου τύπου I, και ειδικότερα κολλαγόνου των οστών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΞΗΓΗΣΗ

Το 90 % περίπου της οργανικής ουσίας των οστών είναι κολλαγόνο τύπου I, μια τριπλή ελικοειδής πρωτεΐνη.¹ Το κολλαγόνο τύπου I των οστών διασταυρώνεται με συγκεκριμένα μόρια που παρέχουν σταθερότητα και δύναμη. Οι διασταυρώσεις του ώριμου κολλαγόνου τύπου I στα οστά περιλαμβάνουν τις διασταυρώσεις πυριδινίου,

πυριδινολίνης (PYD) και δεοξυπυριδινολίνης (DPD).^{1,2} Οι PYD και DPD δημιουργούνται από την ενζυματική δράση της λυσιλικής οξειδάσης στο αμινοξύ λυσίνη.³ Απελευθερώνονται στην κυκλοφορία κατά τη διαδικασία απορρόφησης οστού.^{2,5} Οι διασταυρώσεις πυριδινίου απεκκρίνονται με τα ούρα χωρίς να έχουν μεταβολιστεί και δεν επηρεάζονται από τη διατροφή,⁶ γεγονός που τις κάνει κατάλληλες για την αποτίμηση της απορρόφησης. Τα οστά υποβάλλονται διαρκώς σε μεταβολική διαδικασία που ονομάζεται ανάπλαση.^{2,7} Αυτή συμπεριλαμβάνει την απορρόφηση, μία διαδικασία αποικοδόμησης του οστού στην οποία μεσολαβεί η δράση των οστεοκλαστών, και την οστεογένεση, μία διαδικασία δόμησης στην οποία μεσολαβεί η δράση των οστεοβλαστών.^{2,7} Η ανάπλαση απαιτείται για τη συντήρηση και τη γενικότερη υγεία του οστού ενώ οι δύο διαδικασίες είναι στενά συνδεδεμένες, δηλαδή η απορρόφηση και η οστεογένεση βρίσκονται σε ισορροπία.⁷ Σε μη φυσιολογικές καταστάσεις μεταβολισμού των οστών, η διαδικασία αυτή παύει να αποτελεί ζεύγος και όταν η απορρόφηση ξεπερνά την οστεογένεση το αποτέλεσμα είναι η καθαρή απώλεια οστού.⁷ Η μέτρηση ειδικών προϊόντων εκφυλισμού της ουσίας των οστών παρέχει αναλυτικά δεδομένα σχετικά με το ρυθμό του μεταβολισμού των οστών.^{2,4,5}

Η οστεοπόρωση είναι μία νόσος του μεταβολισμού των οστών, που χαρακτηρίζεται από παθολογική ανάπλαση οστού. Είναι νόσος του περιφερικού σκελετού, που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική μάζα και αποσύνθεση της μικροαρχιτεκτονικής του οστικού ιστού, η οποία έχει ως συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας σε κατάγματα.⁸ Ο πιο κοινός τύπος οστεοπόρωσης εμφανίζεται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ως αποτέλεσμα της ανεπάρκειας οιστρογόνων που προέρχεται από την παύση λειτουργίας των ωοθηκών.⁷ Η επιστροφή στα επίπεδα οιστρογόνων προ της εμμηνόπαυσης με θεραπεία αντικατάστασης παρεμποδίζει την απώλεια οστού και την οστεοπόρωση.^{7,9} Τα οιστρογόνα και μία κατηγορία σκευασμάτων γνωστά ως διφωσφονικά είναι αντιαπορροφητικές θεραπείες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παρεμποδίσουν την απώλεια οστού ή να θεραπεύσουν την οστεοπόρωση.^{7,10} Η οστεοπόρωση μπορεί επίσης να προκληθεί από την αδυναμία απόκτησης επαρκούς μέγιστης οστικής μάζας κατά τα χρόνια της ανάπτυξης, μια ηλικιακά σχετιζόμενη διαταραχή της οστικής ανάπλασης, στην οποία παρατηρείται υπερβολική οστική απορρόφηση, και από μία σειρά κλινικών καταστάσεων και θεραπειών, οι οποίες προκαλούν απώλεια οστού ή διαταραχές στην ανάπλαση οστού.⁷ Αυτές συμπεριλαμβάνουν ασθένειες του ενδοκρινικού συστήματος, όπως υπογοναδισμό, υπερθυρεοειδισμό, υπερπαραθυρεοειδισμό, νεφρική ανεπάρκεια, γαστρεντερικές παθήσεις που σχετίζονται με τη διατροφή και το μεταβολισμό των αλάτων, ασθένειες του συνδετικού ιστού, πολλαπλά μυελώματα, χρόνια ακινησία, αλκοολισμό ή χρήση καπνού και χρόνια

θεραπεία με ηπαρίνη ή κορτικοστεροειδή.⁷ Άλλες ασθένειες που χαρακτηρίζονται από παθολογική ανάπτυξη οστού περιλαμβάνουν τη νόσο του Paget και καρκίνους με μεταστάσεις στα οστά.³

Για την ανάλυση MicroVue PYD, η τεχνολογία χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ενός μονοκλωνικού αντισώματος που παρουσιάζει ειδικότητα για τις διασταυρώσεις πυριδινίου.¹¹ Η ειδικότητα του μονοκλωνικού αντισώματος που χρησιμοποιείται στην ανάλυση MicroVue PYD επιτρέπει την απλή, εύκολη και άμεση, ποσοτική εκτίμηση των PYD και DPD στα ούρα, που μπορεί να αναπαραχθεί.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση MicroVue PYD αποτελεί ανταγωνιστικό ανοσοπροσδιορισμό ενζύμου σε μορφή ταινίας μικροτίτλου που χρησιμοποιεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα διασταύρωσης αντι-πυριδινίου για την μέτρηση των PYD και DPD στα ούρα. Οι PYD και DPD στο δείγμα ανταγωνίζονται για το αντίσωμα με PYD που είναι επιχρισμένο στην ταινία. Η αντίδραση ανιχνεύεται με υπόστρωμα pNPP. Τα αποτελέσματα της MicroVue PYD διορθώνονται για ουρική συγκέντρωση μέσω κρεατινίνης.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

96 αναλύσεις για διασταυρώσεις πυριδινίου

Το κιτ της MicroVue PYD EIA περιέχει τα παρακάτω:

- | | | | |
|----------|--|-------------------------|-------------------------|
| A | Πρότυπα Πυριδινολίνης | Μέρη 4251 – 4256 | 0,3 mL το καθένα |
| B | A = 0, B = 15, C = 40, D = 100, E = 250, F = 750 nmol/L PYD | | |
| C | PYD απομονωμένη από ανθρώπινα ούρα σε 10mmol/L | | |
| D | φωσφορικού οξέος που περιέχει αζίδιο του νατρίου (0,05%) και | | |
| E | χρησιμεύει ως συντηρητικό | | |
| F | | | |
| L | Low Controls | Μέρη 4257 | 0,3 mL το καθένα |
| | (Μάρτυρας Χαμηλής Συγκέντρωσης) | | |
| | PYD απομονωμένη από ανθρώπινα ούρα σε 10 mmol/L | | |
| | φωσφορικού οξέος που περιέχει αζίδιο του νατρίου (0,05 %) και | | |
| | χρησιμεύει ως συντηρητικό | | |
| H | High Controls | Μέρη 4258 | 0,3 mL το καθένα |
| | (Μάρτυρας Υψηλής Συγκέντρωσης) | | |
| | PYD απομονωμένη από ανθρώπινα ούρα σε 10 mmol/L | | |
| | φωσφορικού οξέος που περιέχει αζίδιο του νατρίου (0,05 %) και | | |
| | χρησιμεύει ως συντηρητικό | | |
| 1 | Coated Strips | Μέρος 4668 | 12 τεμάχια |
| | (Πλάκα Μικροανάλυσης) | | |
| | PYD απομονωμένη από βόειο οστό, προσροφημένη στις ταινίες | | |
| 2 | Stop Solution | Μέρος 4702 | 15 mL |
| | (Διάλυμα Παύσης) | | |
| | NaOH 0,5N | | |
| 3 | 10X Wash Buffer | Μέρος 4703 | 55 mL |
| | (10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης) | | |
| | Μη ιοντικό απορρυπαντικό σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει | | |
| | αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό (0,05 %) | | |
| 4 | Assay Buffer | Μέρος 4704 | 55 mL |
| | (Ρυθμιστικό Διάλυμα Ανάλυσης) | | |
| | Μη ιοντικό απορρυπαντικό σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει | | |
| | αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό (0,05 %) | | |
| 5 | Substrate Buffer | Μέρος 4705 | 3 x 10 mL |
| | (Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος) | | |
| | Διάλυμα διεθανολαμίνης και χλωριούχου μαγνησίου που περιέχει | | |
| | αζίδιο του νατρίου (0,05 %) ως συντηρητικό | | |

- | | | | |
|----------|---|-------------------|--------------------|
| 6 | Substrate Tablets | Μέρος 0012 | 3 x 20 mg |
| | (Δισκία υποστρώματος) | | |
| | Φωσφορικό νιτροφαινόλιο | | |
| 7 | Συνδεδεμένο ένζυμο | Μέρος 4250 | 3 τεμάχια |
| | Λυσοφιλοποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού | | |
| | διασταύρωσης αντι-πυριδινίου συζευγμένο με αλκαλική | | |
| | φωσφατάση που περιέχει ρυθμιστικά άλατα και σταθεροποιητές | | |
| | Κάλυμμα Ταινίας Πλάκας | Μέρος 0047 | 3 το καθένα |

ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

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

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΙΣ

- Για διαγνωστική χρήση *In Vitro*.
- Αντιμετωπίστε τα αντιπροσωπευτικά δείγματα ως δυνητικά βιολογικά επικίνδυνα υλικά. Ακολουθήστε τις Γενικές Προφυλάξεις, όταν χειρίζεστε περιεχόμενα αυτού του κιτ και δείγματα ασθενών.
- Απαλλαχθείτε από τα δοχεία και τα μη χρησιμοποιημένα περιεχόμενά τους σύμφωνα με τις ομοσπονδιακές, κρατικές και τοπικές ρυθμιστικές απαιτήσεις.
- Χρησιμοποιήστε τα παρεχόμενα αντιδραστήρια ως ολοκληρωμένη μονάδα πριν από την ημερομηνία λήξης, που αναγράφεται στην ετικέτα της συσκευασίας.
- Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ιματισμό, γάντια και προστασία ματιών/προσώπου όταν χειρίζεστε τα περιεχόμενα αυτού του κιτ.
- Φυλάξτε τα αντιδραστήρια ανάλυσης όπως ορίζεται.
- Μη χρησιμοποιείτε τα Coated Strips, αν ο σάκος είναι διάτρητος.
- Ελέγξτε κάθε δείγμα διπλά.
- Το NaOH 0,5N θεωρείται διαβρωτικό και μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό στο δέρμα. Αποφύγετε την κατάποση. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα, τα μάτια ή τα ρούχα. Αν υπάρξει επαφή, πλύνετε με νερό. Αν ληφθεί από το στόμα, καλέστε γιατρό.
- Το αζίδιο του νατρίου χρησιμοποιείται ως συντηρητικό. Η τυχαία επαφή ή κατάποση ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να προκαλέσει ερεθισμό στο δέρμα, στα μάτια ή στο στόμα. Χρησιμοποιείτε ρυθμιστικά διαλύματα για τους συγκεκριμένους μόνο σκοπούς και αποφύγετε την επαφή με οξέα. Το αζίδιο του νατρίου ενδεχομένως αντιδρά με υδραυλικές σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και πιθανόν να σχηματίσει ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη ξεπλύνετε με άφθονο νερό για να παρεμποδιστεί η δημιουργία αζιδίων.

11. Το ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος περιέχει διαιθανολαμίνη και ενδέχεται να προκαλεί ερεθισμό στα μάτια ή/και στο δέρμα μετά από παρατεταμένη επαφή. Οι περιοχές που έχουν προσβληθεί πρέπει να πλένονται αμέσως με σαπούνι και νερό.
12. Τα πρότυπα και οι μάρτυρες βρίσκονται σε 10 mmol/L φωσφορικού οξέος. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα, τα μάτια ή τα ρούχα. Μην το εισάγετε στο στόμα. Αν υπάρξει επαφή, πλύνετε με νερό. Αν ληφθεί από το στόμα, καλέστε γιατρό.
13. Συνιστάται η χρήση πολυκαναλικών ή επαναληπτικών πιπετών για την εξασφάλιση έγκαιρης χορήγησης αντιδραστηρίων.
14. Για την ακριβή μέτρηση δειγμάτων προσθέστε με ακρίβεια δείγματα και πρότυπα. Λάβετε με πιπέττα χρησιμοποιώντας μόνο βαθμονομημένα όργανα.
15. Μην χρησιμοποιείτε ένα πηγαδάκι μικροανάλυσης για περισσότερες από μία εξετάσεις.
16. Η χρήση χρόνων επώασης και θερμοκρασιών διαφορετικών από εκείνες που υποδεικνύονται στην ενότητα *ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ* ενδέχεται να δώσει εσφαλμένα αποτελέσματα.
17. Η πυριδινολίνη που βρίσκεται στα πρότυπα, στους μάρτυρες, στις επιχρισμένες ταινίες και στα δείγματα ούρων παρουσιάζει ευαισθησία στο φως. Αποφύγετε την παρατεταμένη έκθεση στο φως, ιδιαίτερα άμεσα ή έμμεσα στο φως του ήλιου. Αποθηκεύστε τα αντιδραστήρια σε σκοτάδι, όταν δεν χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα και τα αντιδραστήρια δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από το συνηθισμένο, τεχνητό φως του εργαστηρίου, όταν γίνεται χειρισμός τους όπως ορίζεται στην *ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ*.
18. Μην αφήνετε τα πηγαδάκια μικροανάλυσης να στεγνώσουν όταν έχει ξεκινήσει η ανάλυση.
19. Όταν αφαιρείτε υγρό από τα πηγαδάκια μικροανάλυσης, μην αποξέετε ή αγγίζετε τον πυθμένα των φρεατίων.
20. Για το πλύσιμο της πλάκας πρέπει να χρησιμοποιηθεί φιάλη πλύσης ή αυτοματοποιημένη συσκευή πλήρωσης (*ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ*, Βήμα 8). Για καλύτερα αποτελέσματα, μη χρησιμοποιείτε πολυκαναλικές πιπέτες για να πλύνετε την πλάκα μικροανάλυσης.
21. Αυτή η ανάλυση έχει κριθεί αξιόπιστη για χειροκίνητη πλύση.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης

Βλ. σημείωση διαδικασίας στην ενότητα *ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ*

Παρασκευάστε την απαιτούμενη ποσότητα Wash Buffer 1X (βλ. πίνακα στην ενότητα *ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ*) αραιώνοντας πυκνό Wash Buffer 10X με αποιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10. Φυλάξτε στους 20–28 °C. Χρησιμοποιήστε Wash Buffer 1X μέσα σε 21 μέρες από την παρασκευή.

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

Σύζευγμα ενζύμου

Παρασκευάστε σύζευγμα ενζύμου μέσα σε 2 ώρες από τη χρήση. Διαλύστε εκ νέου κάθε απαιτούμενο φιαλίδιο συζεύγματος ενζύμου (βλ. Πίνακα) με 7 mL κρύο Assay Buffer. Αποθηκεύστε το σύζευγμα ενζύμου σε 2–8 °C μέχρι τη χρήση.

Διάλυμα υποστρώματος εργασίας

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

ΦΥΛΑΞΗ

Φυλάξτε το κιτ σε 2–8 °C.

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

Φυλάξτε 1X Wash Buffer (αραίωση 10X) σε 20–28 °C.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η ανάλυση MicroVue PYD μπορεί να εκτελεστεί με τη χρήση των πρώτων πρωϊνών ούρων που συλλέχθηκαν χωρίς συντηρητικά ή των δεύτερων πρωϊνών ούρων. Οι συλλογές κατά μήκος (π.χ. για τον υπολογισμό μεταβολών της απορρόφησης) θα πρέπει να συλλέγονται την ίδια περίπου ώρα κάθε μέρα. Το δείγμα ούρων μπορεί να φυλαχθεί σε ψυγείο (2–8 °C) έως 7 ημέρες ή το κατεψυγμένο δείγμα σε ≤ -20 °C για πιο μακροχρόνια αποθήκευση. Μην υποβάλλετε τα δείγματα σε περισσότερους από 3 κύκλους ψύξης/τήξης. Αποφύγετε την παρατεταμένη έκθεση στο φως, ιδιαίτερα στο ηλιακό. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ρουτίνας, τα δείγματα δεν επηρεάζονται από τον συνηθισμένο, τεχνητό εργαστηριακό φωτισμό.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Πριν ξεκινήσετε την ανάλυση διαβάστε ολόκληρο το ένθετο του προϊόντος.

Πριν προχωρήσετε βλ. ενότητα *ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ*.

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

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

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

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

Επώαση δείγματος/συζεύγματος ενζύμου

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

Βήμα πλύσης

8. Παρασκευάστε την απαιτούμενη ποσότητα Wash Buffer 1X (βλ. πίνακα) αραιώνοντας Wash Buffer 10X με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:10. Αντιστρέψτε/αδειάστε τις ταινίες χειροκίνητα (από το βήμα 6). Προσθέστε τουλάχιστον 250 μL 1X Wash Buffer σε κάθε πηγαδάκι και αντιστρέψτε/αδειάστε τις ταινίες χειροκίνητα. Επαναλάβετε άλλες δύο φορές, ήτοι συνολικά τρεις πλύσεις. Μετά την τελευταία πλύση, στεγνώστε τις ταινίες καλά σε χάρτινες πετσέτες. Ενώ οι ταινίες είναι αντεστραμμένες, σκουπίστε προσεκτικά το κάτω μέρος των ταινιών με μια χάρτινη πετσέτα χωρίς χνούδι για να βεβαιωθείτε ότι το κάτω μέρος των ταινιών είναι καθαρό.

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

Επώαση υποστρώματος

9. Προσθέστε 150 μL διάλυμα υποστρώματος εργασίας σε κάθε πηγαδάκι.
10. Επώαση για 60 λεπτά (± 5 λεπτά) στους 20–28 °C.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Αν η θερμοκρασία δωματίου δεν μπορεί να διατηρηθεί μεταξύ 20–28 °C και η απορρόφηση που είναι >2,0 δεν είναι συμβατή με τον αναγνώστη πλάκας σας, παρακολουθήστε την εξέλιξη του υποστρώματος στα πηγαδάκια Standard A. Σταματήστε την αντίδραση, όταν η οπτική πυκνότητα φτάσει το 1,2–1,5. Στη συνέχεια, διαβάστε τις ταινίες.

Παύση/ανάγνωση

11. Προσθέστε 100 μL Stop Solution σε κάθε πηγαδάκι. Προσθέστε το Stop Solution με τον ίδιο τρόπο και στα ίδια χρονικά διαστήματα που προσθέσατε το Substrate Solution.
12. Διαβάστε την οπτική πυκνότητα στα 405 nm. Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν μεγάλες φυσαλίδες στα πηγαδάκια και ότι το κάτω μέρος των ταινιών είναι καθαρό. Οι ταινίες πρέπει να διαβαστούν μέσα σε **15 λεπτά** από την προσθήκη του Stop Solution.
13. Χρησιμοποιήστε λογισμικό που παρέχει ποσοτική εκτίμηση για την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης 4 παραμέτρων για να αναλύσετε τα αποτελέσματα της μελέτης MicroVue PYD.
Εξίσωση: $y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$
14. Προσδιορίστε τη συγκέντρωση των δειγμάτων και των μαρτύρων από την πρότυπη καμπύλη.
 - a. Αραιώστε δείγματα με συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 750 nmol/L σε Assay Buffer και επαναλάβετε την εξέταση. Συμπεριλάβετε το συντελεστικό αραιώσης στον τελικό υπολογισμό.
 - b. Οι τιμές των μαρτύρων θα πρέπει να είναι εντός του εύρους που ορίζεται από το πιστοποιητικό ανάλυσης που σας παρέχεται μαζί με το kit.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

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

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

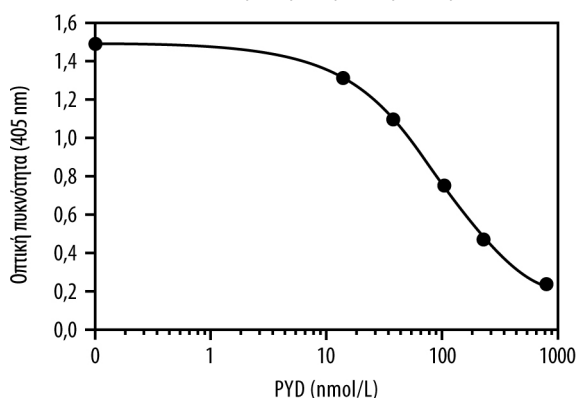
Αν η οπτική πυκνότητα του Προτύπου A MicroVue PYD είναι μικρότερη από 0,8, τα αποτελέσματα πρέπει να θεωρηθούν αμφισβητήσιμα και τα δείγματα πρέπει να επαναληφθούν.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

Αντιπροσωπευτική πρότυπη καμπύλη

Πρότυπα επίπεδα PYD: 0, 15, 40, 100, 250, 750 nmol/L



ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Ενώ η MicroVue PYD χρησιμοποιείται ως δείκτης της απορρόφησης κολλαγόνου τύπου I, ιδιαίτερα κολλαγόνου των οστών, η χρήση της εξέτασης αυτής δεν έχει εδραιωθεί για την πρόβλεψη της ανάπτυξης οστεοπόρωσης ή του κινδύνου μελλοντικών καταγμάτων. Η χρήση του τεστ αυτού δεν είναι εδραιωμένη κατά την εμμηνόπαυση, τη νόσο οστών του Paget, τον πρώιμο υπερπαραθυροειδισμό ή τον υπερθυροειδισμό. Σύγχυση των αποτελεσμάτων μπορούν να συμβεί σε πάσχοντες από κλινικές παθήσεις που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την απορρόφηση κολλαγόνου των οστών, όπως μεταστάσεις σε οστά μαζί με τις ασθένειες και τις παθήσεις που αναφέρονται παραπάνω. Τα αποτελέσματα του MicroVue PYD θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με κλινικά ευρήματα και άλλα διαγνωστικά αποτελέσματα.

ΤΙΜΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Διαστήματα αναφοράς του MicroVue PYD έχουν ορισθεί για υγιείς άνδρες (n = 118) και υγιείς γυναίκες πριν από την εμμηνόπαυση (n = 301) πάνω από 25 ετών. Για λόγους ορισμού διαστημάτων αναφοράς, ως φυσιολογικά άτομα ορίστηκαν:

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

Οι τιμές μπορεί να επηρεαστούν από παράγοντες όπως η χαμηλή παραγωγή οιστρογόνων, η χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου, η χαμηλή σωματική δραστηριότητα ή οι ασθένειες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τον μεταβολισμό των οστών, όπως η οστεοπόρωση, η νόσος του Paget, ο υπερπαραθυροειδισμός, ο υπερθυροειδισμός και οι μεταστάσεις στα οστά. Η έλλειψη οιστρογόνων σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη οστική απορρόφηση. Συνιστάται να χρησιμοποιηθούν οι τιμές αναφοράς για τις γυναίκες πριν από την εμμηνόπαυση για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των γυναικών μετά την εμμηνόπαυση. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει το δικό του κανονικό εύρος τιμών αναφοράς. Το εύρος εκφράζεται ως μη παραμετρικά διαστήματα αναφοράς (διαστήματα εμπιστοσύνης 90 %).

Φύλο	Εύρος (nmol/mmol)	Μέσο (nmol/mmol)	SD (nmol/mmol)
Γυναίκες	16,0 – 37,0	25,5	7,5
Άνδρες	12,8 – 25,6	18,5	4,4

Η αναμενόμενη διακύμανση στο ίδιο άτομο προσδιορίστηκε από δείγματα ούρων 49 υγιών ατόμων (26 γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση και 23 άνδρες) που συλλέχθηκαν επί πέντε μη συνεχόμενες μέρες κατά τη διάρκεια δύο εβδομάδων. Η μέση τιμή της διακύμανσης στο ίδιο άτομο ήταν 15 %. Η διακύμανση ανάμεσα σε άτομα αντιπροσωπεύεται στα μη παραμετρικά διαστήματα αναφοράς που φαίνονται παραπάνω.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Ειδικότητα αντισωμάτων

Το μονοκλωνικό αντίσωμα διασταύρωσης αντιπυριδινίου διαθέτει επιλεκτική, υψηλή συγγένεια με τις ελεύθερες PYD και DPD και αμελητέα πρόσδεση με πεπτιδία PYD και DPD.

	% Αντιδραστικότητα
Ελεύθερα PYD	100%
Ελεύθερα DPD	100%
Πεπτιδία PYD/DPD ≥ 1000 MW	< 2,5%

Ευαισθησία

Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της ανάλυσης MicroVue PYD είναι 7,5 nmol/L, το οποίο καθορίζεται από το ανώτατο όριο 3 SD σε μελέτη ακριβείας μηδενικού προτύπου.

Ανάκτηση – Ανάκτηση Spike

Η ανάκτηση spike καθορίζεται προσθέτοντας μία γνωστή ποσότητα καθαρισμένης PYD στα δείγματα ούρων με διαφορετικά επίπεδα ενδογενούς PYD. Τα τυπικά αποτελέσματα δίνονται παρακάτω.

Δείγμα	Ενδογενής (nmol/L)	Προστιθέμενη (nmol/L)	Παρατηρημένη (nmol/L)	Ανάκτηση (%)
1	16,7	68,2	84,1	99
2	71,0	68,2	140,8	102
3	141,0	68,2	215,5	109

Ανάκτηση - Γραμμικότητα

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

Δείγμα	Συντελεστής αραιώσης	Παρατηρημένη (nmol/L)	Αναμενόμενη (nmol/L)	Ανάκτηση (%)
1	neat	261,6	-	-
	1:2	127,8	130,8	98
	1:4	59,9	65,4	92
	1:8	31,1	32,7	95
2	neat	382	-	-
	1:2	183,2	191,0	96
	1:4	90,4	95,5	95
	1:8	57,9	57,1	95
3	neat	412,3	-	-
	1:2	199,0	206,2	96
	1:4	98,2	103,1	95
	1:8	47,8	54,5	98

Ακρίβεια

Η ακρίβεια εντός του ίδιου κύκλου προσδιορίστηκε για 52 επαναλήψεις 3 δειγμάτων σε 1 πλάκα από 3 παρτίδες κιτ (συνολικά 3 πλάκες). Η ακρίβεια μεταξύ των κύκλων προσδιορίστηκε αναλύοντας 3 δείγματα σε 8 ξεχωριστές πλάκες σε κάθε μία από 3 παρτίδες κιτ (συνολικά 24 πλάκες). Τα παρακάτω δείγματα αναπαριστούν εύρος τιμών nmol/L. Για γυναίκα με κρεατινίνη 5,0 mmol/L, τα δείγματα 1 έως 3 αναπαριστούν τη χαμηλή κανονική, την υψηλή κανονική και την αυξημένη απορρόφηση (13,2 nmol/mmol, 32,0 nmol/mmol, και 81,4 nmol/mmol αντίστοιχα).

PYD (nmol/L)	Εντός του κύκλου ¹ C.V. (%)	Μεταξύ των κύκλων ² C.V. (%)
66	9,9	11,2
160	7,0	5,8
407	6,6	3,9

¹ n = 52

² n = 8 κύκλοι

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Κλινικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση των επιπέδων διασταυρώσεων πυριδινίου που αποκτήθηκαν με την ανάλυση MicroVue PYD σε δείγματα ούρων. Η πρώτη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σημεία κλινικών ερευνών με τη χρήση 52 δειγμάτων από υγιείς εθελοντές και 138 δειγμάτων από ασθενείς που έπασχαν από γνωστές παθήσεις των οστών (οστεοπόρωση, φαρμακογενή οστεοπόρωση, νόσος του Paget, υπερπαραθυροειδισμό και υπερθυροειδισμό). Οι παθήσεις αυτές σχετίζονται συχνά με αυξημένη απορρόφηση κολλαγόνου των οστών τον καιρό της συλλογής δειγμάτων.

Η μελέτη συνέκρινε την ανάλυση MicroVue PYD με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) για τη μέτρηση της PYD.¹² Ο ουδός HPLC προσδιορίστηκε σε μια μελέτη που περιλάμβανε 84 υγιή ενήλικα άτομα και βρέθηκε 50 nmol/L για τους άνδρες και 60 nmol/mmol για τις γυναίκες (ανώτερο όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης 95 % για κάθε φύλο). Εκατόν ένας από τους 138 ασθενείς με διαγνωσμένη πάθηση των οστών δεν είχαν αυξημένες τιμές PYD όταν μετρήθηκαν με HPLC.

Οι τιμές διασταύρωσης πυριδινίου PYD στα υγιή άτομα κυμαίνονταν από 13,7 ως 49,4 nmol/mmol και στους ασθενείς από 9,8 ως 135,9 nmol/mmol.

Η χρήση αυξημένης PYD που καθορίστηκε από την HPLC ως μέθοδος κατηγοριοποίησης και η ROC χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της ιδανικής σχετικής ευαισθησίας και ειδικότητας στον πληθυσμό που περιγράφηκε. Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Ένας πίνακας παράπλευρων επιπτώσεων 2x2 που παρουσιάζει τον αριθμό των ατόμων σε κάθε κατηγοριοποίηση παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.

Πίνακας 1

MicroVue PYD

Σχετική Ευαισθησία	84 %
Εξειδίκευση	82 %

Εικόνα 1

HPLC PYD

		Αυξημένη +	Μη αυξημένη -
MicroVue PYD	+	38	26
	-	7	119

Σε μια δεύτερη μελέτη, τα αποτελέσματα της ανάλυσης MicroVue PYD συγκρίθηκαν με ανάμικτο πληθυσμό 39 δειγμάτων από υγιή άτομα και 99 δειγμάτων από ασθενείς με την νόσο του Paget. Αν και η νόσος του Paget αντιπροσωπεύει ένα μοντέλο για την αναγνώριση της ενεργής απορρόφησης κολλαγόνου των οστών, κάποιοι από τους ασθενείς στη μελέτη αυτή λάμβαναν θεραπεία ή παρουσίαζαν ύφεση και ενδέχεται να μην είχαν αυξημένη απορρόφηση τον καιρό της συλλογής των δειγμάτων. Στη μελέτη αυτή, τα υγιή άτομα κυμαίνονταν μεταξύ 12,8 και 33,2 nmol/mmol. Οι ασθενείς με νόσο του Paget κυμαίνονταν μεταξύ 14,4 και 667,6 nmol/mmol.

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

Πίνακας 2

MicroVue PYD

Σχετική Ευαισθησία	89 %
Εξειδίκευση	95 %

Εικόνα 2

Διάγνωση Paget

		Ναι +	Όχι -
MicroVue PYD	+	88	2
	-	11	37

ΒΟΗΘΕΙΑ

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

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

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Seyedin SM, Rosen DM. Matrix Proteins of the Skeleton. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1990;2:914-919.
2. Delmas PD. Biochemical markers for the assessment of bone turnover. In: Riggs BL, Melton LJ,III (eds): *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1995, pp. 319-333.
3. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. Urinary pyridinium crosslinks of collagen: specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Trends Endocrinol.Metab.* 1992;3:263-270.
4. Delmas PD, Schlemmer A, Gineyts E, Riis B, Christiansen C. Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. *J.Bone Miner.Res.* 1991;6:639-644.
5. Eastell R, Colwell A, Hampton L, Reeve J. Biochemical markers of bone resorption compared with estimates of bone resorption from radiotracer kinetic studies in osteoporosis. *J.Bone Miner.Res.* 1997;12:59-65.
6. Colwell A, Russell RG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur.J.Clin.Invest.* 1993;23:341-349.
7. Riggs BL. Overview of osteoporosis. *West.J.Med.* 1991;154:63-77.
8. Consensus Development Statement. Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? *Osteoporos.Int.* 1997;7:1-6.
9. The Writing Group for the PEPI Trial. Effects of hormone therapy on bone mineral density: results from the postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. *JAMA* 1996;276:1389-1396.
10. 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.
11. Gomez B Jr, Ardakani S, Evans BJ, et al. Monoclonal antibody assay for free urinary pyridinium cross-links. *Clin.Chem.* 1996;42:1168-1175.
12. 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.
13. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (supplno.2S):001.

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ



Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης στο CDROM



Προοριζόμενη Χρήση

REF 8010 – **MICROVUE** PYD 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