

TSEKKI/ČESKY

UniQ®

PINP RIA

**Intaktní N-terminální propeptid prokolagenu typu I
Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky s navázanou
protilátkou
Kat.č.67034**

Návod k použití soupravy

Leden 2013

Určený účel použití	3
Souhrn a výklad	3
Princip testu	4
Reagencie	5
Odběr vzorku	7
Manipulace se vzorkem; skladování vzorku	7
Pracovní postup	8
Zajištění jakosti	9
Výpočet výsledků	10
Omezení pracovního postupu	11
Očekávané hodnoty	12
Klinické studie	14
Analytické parametry měření	20
Návaznost	22
Literatura (viz originální příbalová informace)	


ORION
DIAGNOSTICA

Výrobce:
Orion Diagnostica Oy
Koivu-Mankkaan tie 6 B
P.O. Box 83, 02101 Espoo, Finland
tel. +358-10-4261
fax. +358-10-426 2794
www.oriondiagnostica.com

CE

Vysvětlení symbolů použitých na štítcích



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Použitelné do



Teplota skladování



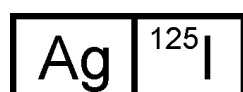
Viz návod k použití



Výrobce



Vhodné pro



Radioindikátor



Antisérum



Kontrola



Koncentrace kalibrátoru



Původ: lidský



Obsahuje azid sodný



Škodlivé

URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Orion Diagnostica UniQ PINP RIA je kvantitativní radioimunoanalytický test určený pro měření koncentrací intaktního aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP), indikátoru osteoblastické aktivity, v lidském séru. Test je určen k použití jako pomocník při sledování postmenopauzální osteoporózy. *Pro diagnostické použití in vitro.*

SOUHRN A VÝKLAD

Kolagen typu I, který je syntetizován fibroplasty a osteoblasty, je nejrozšířenějším typem kolagenu v těle a je jediným typem kolagenu, který se vyskytuje v mineralizované kosti, kde představuje více než 90 % organické kostní hmoty. Protože kost je hlavním kolagenovým orgánem a během života metabolicky vysoce aktivním, největší část syntetizovaného kolagenu I pochází z kostních osteoblastů.

Kolagen typu I je odvozen z většího proteinu, kterým je prokolagen typu I, který je složen ze tří aminokyselinových řetězců svinutých do helixu ve tvaru tyčky. Kolagen typu I má propeptidová prodloužení na obou koncích molekuly, která se odštěpují pomocí specifických proteináz před tím, než jsou takto uspořádané molekuly uspořádány do kolagenových vláken. Oba propeptidy lze nalézt v krevním oběhu, kde jejich koncentrace v zásadě odráží rychlost syntézy kolagenu typu I. UniQ PINP RIA test měří sérovou koncentraci aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP).¹ Protože je koncentrace tohoto prodlouženého propeptidu přímo úměrná množství kolagenu umístěného do kosti, lze jej použít k hodnocení kostní formace.

Během kostní formace je kostní matrice produkována před tím, než se objeví mineralizace, proto je PINP časným markerem kostní formace. Kostní alkalická fosfatáza, buněčný membránový enzym přítomný v preosteoblastech a osteoblastech, je dalším časným markerem osteoblastické aktivity². Osteokalcin je pozdější marker osteoblastické diferenciace, který se objevuje ve fázi mineralizace kosti.³

Kostní tkáň je značně metabolicky aktivní a během celého života dochází ke stálé remodelaci. Remodelace kosti se dosahuje dvěma protichůdnými ději: kostní formací a kostní resorpcí, které jsou za normálních podmínek spolu úzce svázané. Nemoci kostního metabolismu jsou charakteristické nerovnováhou kostního obratu a často dochází k neprovázanosti mezi kostní formací a kostní resorpcí⁴. Indikátory obratu kolagenu typu I, jako je PINP, jsou velmi užitečné k vyšetřování skeletální remodelace za normálních i abnormálních podmínek. Test UniQ PINP RIA poskytuje citlivý nástroj k hodnocení zvýšeného kostního obratu u postmenopauzálních žen⁵⁻⁹ a může být částečně úspěšným nástrojem pro monitorování vlivu antiresorpční a

anabolické terapie na kostní metabolismus¹⁰⁻²¹. Stanovení PINP bylo použito i k detekci zvýšené změny aktivity kolagenu typu I u onemocnění jako je např. Pagetova kostní choroba²²⁻²⁴ a u kostních metastáz rakoviny. Stanovení PINP může být užitečné k hodnocení kostní metastatické aktivity a k predikci přežití.²⁵⁻²⁷

PRINCIP TESTU

Test UniQ PINP RIA firmy Orion Diagnostica je založen na technice kompetitivní radioimunoanalýzy. Znamé množství značeného PINP a neznámé množství neznačeného PINP soutěží o omezený počet vysoce afinitních vazebných míst polyklonální králičí protilátky proti PINP. K separaci PINP navázaného na protilátku a volného PINP se používá sekundární protilátka proti králičímu IgG navázaná na kaolinové částice. Radioaktivita navázaného značeného antigenu (radioindikátoru) je měřena na gamma-čítači. Množství značeného PINP v zkumavce se vzorkem je nepřímo úměrné množství PINP ve vzorku. Koncentrace PINP v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky, která se testuje souběžně pomocí UniQ PINP RIA kalibrátorů obsahujících od 0 do 250 µl/l PINP.

REAGENCIE

Každá souprava obsahuje dostatečné materiály pro 100 zkumavek.

Materiály dodávané v soupravě

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
PINP RIA TRACER: RADIOINDIKÁTOR PINP RIA: Připraven k použití. Radioindikátorem je [¹²⁵ I]- značený PINP v PBS tlumivém roztoku (fosfátem pufovaný fyziologický roztok). NaN ₃ a červené barvivo.	1 lahvička 22 ml Radioaktivita <200kBq	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
PINP RIA ANTISERUM: ANTISÉRUM PINP RIA: Připraveno k použití. Králíčí antisérum v PBS tlumivém roztoku. NaN ₃ a modré barvivo.	1 lahvička 22 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
PINP RIA CALIBRATORS: KALIBRÁTORY PINP RIA: Připraveny k použití. Koncentrace PINP 0; 5; 10; 25; 50; 100 a 250 µg/l v PBS tlumivém roztoku. NaN ₃ . <i>Kalibrováno proti interně připravené master kalibrační soupravě.</i>	7 lahviček 0,5 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
PINP RIA CONTROLS 1&2: PINP RIA KONTROLY 1&2: Lyofilizované lidské serum. NaN ₃ . <i>Očekávané hodnoty jsou uvedeny na zvláštním listě.</i>	2 lahvičky Rekonstituovat 1 ml destilované nebo deionizované vody	Při teplotě 2 – 8°C 6 týdnů po rekonstituci. Delší dobu skladujte při teplotě -20°C. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.
PROCOLLAGEN SEPARATION REAGENT: PROKOLAGENOVÁ SEPARAČNÍ REAGENCIE: Připravena k použití. Separační reagent je suspenze sekundární protilátky kovalentně vázané k pevné bázi. NaN ₃ .	1 lahvička 60 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.

Reagencie obsahují NaN₃ jako konzervační činidlo, čtěte “Upozornění a varování”.

Upozornění a varování

VAROVÁNÍ 1: Pro diagnostické použití *in vitro*. Není určeno pro interní nebo externí použití u lidí nebo u zvířat.

Používejte pouze součásti jedné soupravy. Nemíchejte součásti s navázanou protilátkou z různých šarží souprav. Reagencie nepoužívejte po expirační době soupravy.

Změny fyzikálního stavu reagensů nebo ve sklonu kalibrační křivky nebo hodnoty kontrolního séra mimo rozmezí přípustné výrobcem mohou být indikátorem nestability reagensů. Reagencie nepoužívejte, jestliže máte podezření na zhoršení stavu reagensů.

Nepipetujte ústy. Při práci s radioaktivním materiálem je zakázáno jíst, pít nebo kouřit. Používejte jednorázové rukavice a vhodný ochranný oděv. Zabraňte kontaktu s kůží a očima. Po skočení práce s těmito látkami si důkladně umyjte ruce. Ukápnutý materiál je nutno okamžitě omýt velkým množstvím vody a dekontaminovat dle příslušných nařízení pro likvidaci nehodou ukápnutých materiálů.

Se všemi reagensy pracujte a také je likvidujte dle příslušných předpisů.

VAROVÁNÍ 2: Souprava obsahuje ^{125}I (poločas rozpadu $T_{1/2}$ 60 dní) emitující 35,5 keV gama záření a 27 - 32 keV rentgenového záření.

Radioaktivní materiál obsažený v této soupravě mohou přijímat, skladovat a používat pouze lékaři, klinické laboratoře, výzkumné ústavy nebo nemocnice a mohou být používány pouze pro klinické nebo laboratorní testování *in vitro*, které nezahrnuje interní ani externí podávání materiálu nebo radiace z něj pramenící lidem nebo zvířatům. Všechny radioaktivní materiály skladujte a manipulujte s ním jen na místech k tomu určených. Prodej, skladování, používání nebo manipulace s radioaktivním materiálem podléhá zákonům v zemi uživatele nebo nařízením United States Nuclear Regulatory Commission (NCR) nebo nařízením příslušného místního regulačního úřadu.

Ukápnutý radioaktivní materiál je nutno okamžitě setřít detergentem a kontaminované čisticí materiály umístit do sběrné nádoby pro radioaktivní odpad nebo likvidovat podle doporučení Státního úřadu pro jadernou bezpečnost.

Pevný nebo suchý radioaktivní odpad musí být likvidován podle příslušných předpisů.

Prostudujte si předpisy pro jadernou bezpečnost a nařízení příslušného úřadu pro manipulaci a likvidaci radioaktivních materiálů.

Radioaktivní materiál, určený do odpadu, musí být likvidován v souladu s platnými právními předpisy v daném státě.

VAROVÁNÍ 3: Se všemi vzorky pacientů je nutno pracovat jako s **potenciálně infekčním** materiálem. Výchozím materiálem pro kalibrátory je lidská krev, která byla testována a sledována negativní na HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV protilátky. Vzhledem k tomu, že žádný známý test nemůže dát jistotu, že materiál není infekční, pracujte s ním jako s materiálem potenciálně infekčním.

VAROVÁNÍ 4: Reagencie obsahují **azid sodný (NaN₃)** jako konzervační činidlo. Lyofilizované reagencie obsahují < 1% azidu sodného. Nevdechujte, nepolykejte, a zabraňte kontaktu s kůží. Prodloužením expozice se zvyšuje nebezpečí vážného poškození zdraví. Po rekonstituci obsahují kalibrátory < 0,1% azidu sodného, což se za škodlivou koncentraci nepovažuje.

Azid sodný může reagovat s olověným nebo měděným potrubím za tvorby vysoce explozivních azidů příslušných kovů. Jako prevenci tvorby a usazování azidů v potrubí opláchněte vše před likvidací velkým množstvím vody. Navíc by mělo být kovové potrubí opláchnuto také 10% hydroxidem sodným. Při kontaktu s kyselinami tvoří NaN₃ toxické výpary.

ODBĚR VZORKU

Před odběrem vzorku není nutná žádná speciální příprava pacienta. Používejte sérum, asepticky odeberte venózní krev za dodržení běžných bezpečnostních opatření. Test neprovádějte se vzorky plazmy.

MANIPULACE SE VZORKEM; SKLADOVÁNÍ VZORKU

Po odběru vzorku nechte krev srazit a separujte sérum centrifugací.

Vzorky sér se mohou skladovat až 5 dnů při teplotě 2 – 8°C. Delší dobu skladujte při teplotě -20°C a méně. Je třeba se vyhnout opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorku.

Vzorky s vysokou koncentrací PINP mohou být ředěny fyziologickým roztokem.

PRACOVNÍ POSTUP

Požadovaný materiál

Seznam reagensií - viz. sekce Reagencie.

Potřebný materiál, který není součástí soupravy:

MIKROPIPETY (pro přesné dávkování 50 μ l, 200 μ l, 500 μ l a 1000 μ l)

TESTOVACÍ ZKUMAVKY (z polystyrenu, např. 12 x 75 mm)

BUNIČITÁ VATA

KRYCÍ FOLIE PARAFILM

VIBRAČNÍ MÍCHADLO

VODNÍ LÁZEŇ (s teplotou $37 \pm 1^\circ\text{C}$)

DEKANTOVACÍ STOJÁNEK

CENTRIFUGA (s odstředivou silou nejméně 2000 g, nejlépe chlazená)

GAMA-ČÍTAČ

DESTILOVANÁ NEBO DEIONIZOVANÁ VODA

Rekonstituce kontrol

Všechny lahvičky s reagensiemi, dříve než je otevřete, vytemperujte na pokojovou teplotu ($18 - 25^\circ\text{C}$). Kontroly rekonstituujte přídatkem 1,0 ml destilované nebo deionizované vody do každé lahvičky. Zavřete víčko a důkladně promíchejte jemným kroužením nebo převrácením, zamezte přitom tvorbě pěny. Před použitím nechte stát 30 minut.

Podrobný popis postupu

1. Před použitím **vytemperujte** všechny reagencie a vzorky na laboratorní teplotu ($18 - 25^\circ\text{C}$). Všechny reagencie před použitím dobře promíchejte jemným převrácením.
2. **Označte** polystyrénové zkumavky v duplikátech pro nespecifickou vazbu (NSB), kalibrátory, kontroly, patientské vzorky a zkumavky pro celkovou aktivitu.
3. **Napipetujte** do každé zkumavky 50 μ l kalibrátoru, kontrolního a patientského vzorku. Do zkumavek pro stanovení nespecifické vazby (NSB) lze pipetovat jakýkoliv patientský vzorek nebo kalibrátor 0 $\mu\text{g/l}$.
4. Do všech zkumavek **přidejte** 200 μ l radioindikátoru PINP RIA (červený).
5. Do všech zkumavek kromě NSB a celkové aktivity **napipetujte** 200 μ l roztoku antiséra PINP RIA (modrý). Do zkumavek určených pro stanovení NSB přidejte 200 μ l destilované nebo deionizované vody.

6. Obsah všech zkumavek důkladně **promíchejte** na vibračním míchadle, zkumavky překryjte fólií a **inkubujte** 2 hodiny při $37\pm 1^\circ\text{C}$.
7. Prokolagenové separační činidlo nejprve důkladně **promíchejte** šetrným převrácením lahvičky dnem vzhůru a **přidejte** po 500 μl do všech zkumavek kromě zkumavek na celkovou aktivitu.
8. Obsah zkumavek důkladně **promíchejte** (na vibračním míchadle) a **inkubujte** 30 minut při laboratorní teplotě.
9. **Centrifugujte** všechny zkumavky kromě zkumavek pro celkovou aktivitu 15 minut při 2000 g při teplotě v rozmezí 4 - 20°C (doporučovaná teplota je 4°C).
10. Obsah všech zkumavek, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, **dekatujte**. Jemně klepněte zkumavkami do buničité vaty a ponechte několik vteřin odkapat, aby se odstranil i poslední zbytek kapaliny. Dejte pozor, aby nedošlo k dekantaci sraženiny. **Zkumavky jednou otočené nazpět již znovu dnem vzhůru neotáčejte**. Pokud ve zkumavkách zůstanou zbytky kapaliny, způsobí to rozptyl v hodnotách replikátů a chybné hodnoty.
11. **Změřte** radioaktivitu všech zkumavek pomocí gamma-čítače po dobu 1 minuty.
12. Vypočtete výsledky podle postupu uvedeného v části „Výpočet výsledků“.

ZAJIŠTĚNÍ JAKOSTI

Všem klinickým laboratořím je v rámci interního programu zajišťování jakosti doporučováno provádět kontrolu postupu stanovením koncentrací při horní i při dolní hranici kalibrační křivky. Souprava UniQ PINP RIA obsahuje dva kontrolní materiály: PINP RIA kontroly 1 a 2. Očekávané rozsahy kontrol jsou uvedeny na zvláštním letáku, dodávaném se soupravou. Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila vlastní přijatelný rozsah vnitřních kontrol používaných v dané laboratoři. Střední hodnota rozsahu kontrolních vzorků má spadat do stanoveného rozsahu uváděného výrobcem. Pro stanovení hodnot kontrolních vzorků se doporučuje použít soupravy nejméně dvou různých šarží. Poté, co se stanoví rozsah kontrol, musí se kontroly analyzovat v duplikátech při každém stanovení.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Při automatickém výpočtu výsledků doporučujeme použít funkci spline. Výsledky lze také odečíst manuálně z kalibrační křivky vynesené v semilogaritmických souřadnicích.

Vypočtete střední hodnotu impulsů pro všechny kalibrátory, vzorky, kontroly a nespecifickou vazbu.

Vypočtete % (B/B₀) podle vzorce:

$$\% (B/B_0) = \frac{(\text{četnost kalibrátoru nebo vzorku} - \text{NSB}) \times 100}{(\text{četnost nulového kalibrátoru} - \text{NSB})}$$

kde B je navázaná radioaktivita vzorku nebo kalibrátoru, B₀ je navázaná radioaktivita kalibrátoru 0 a NSB je radioaktivita nespecifické vazby.

Vyneste kalibrační křivku na semilogaritmický papír z hodnot % (B/B₀) na ose **y** a odpovídajících koncentrací PINP (μg/l) kalibrátorů na ose **x**.

Stanovte koncentrace PINP v neznámých vzorcích odečtením z kalibrační křivky.

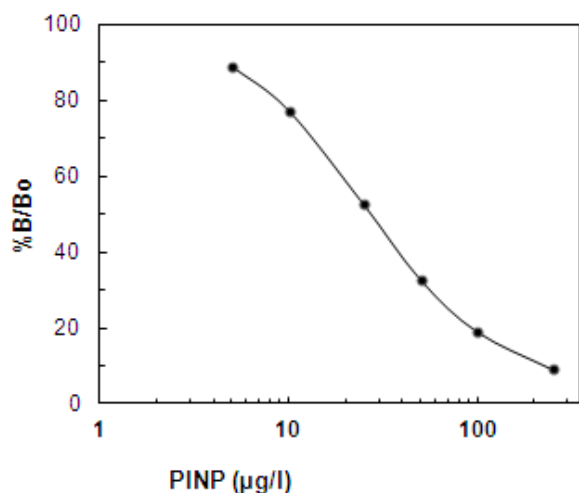
Pokud je u vzorku stanovena hodnota nižší než je hodnota nejnižšího kalibrátoru, měla by být nahlášena hodnota ve stanovené výši.

Každý vzorek se stanovenou hodnotou vyšší, než je hodnota nejvyššího kalibrátoru, musí být naředěn a znovu stanoven. Po naředění musí být hodnoty opraveny použitím ředícího faktoru.

Obr. 1

Typická kalibrační křivka.

Tato kalibrační křivka je pouze orientační.



Tabulka 1

Výpočet výsledků při použití typických údajů.

Tato data jsou pouze orientační a nesmí být použita pro výpočet jakýchkoli výsledků vzorků.

Zkumavka	Průmě r cpm	Cpm – NSB	%B/B₀	PINP (µg/l)
Celková aktivita	50970			
NSB	845			
Kal. 0 µg/l	28330	27485		
Kal. 5 µg/l	25343	24498	89.1	
Kal. 10 µg/l	22134	21289	77.5	
Kal. 25 µg/l	15344	14499	52.8	
Kal. 50 µg/l	9897	9052	32.9	
Kal. 100 µg/l	6095	5250	19.1	
Kal. 250 µg/l	3379	2534	9.2	
Nezn. vz. 1	10725	9880	35.9	44.6
Nezn. vz. 2	4572	3727	13.6	157

OMEZENÍ PRACOVNÍHO POSTUPU

Výsledky, získané touto soupravou, musí být při stanovení diagnózy a dalšího léčebného postupu použity pouze ve spojitosti s ostatními relevantními klinickými informacemi. Proto se souprava UniQ PINP RIA nedoporučuje

pro použití při screeningu k detekci osteoporózy u obecné populace.

Pokud vyhodnocujete postupně odebírané vzorky, odebírejte je ve stejnou denní dobu, protože dochází k diurinálnímu kolísání PINP a noční hodnoty jsou vyšší.

Kolagen typu I je také syntetizován fibroplasty a proto může být nalezen v řídkých pojivových tkáních spolu s ostatními typy kolagenu. Protože je však kost hlavní kolagenový orgán a je v průběhu života metabolicky aktivní, většina cirkulujícího PINP má původ v osteoblastech²⁸.

PINP je metabolizován v játrech²⁹. Vážné onemocnění jater může ovlivnit jejich pročišťovací schopnost a způsobit tak zvýšené sérové hodnoty PINP.³⁰

Jako u většiny souprav, které používají sekundární protilátku, vzorky obsahující protilátky (např. heterofilní protilátky) reagující s králičím nebo kozím IgG, mohou způsobit chybné výsledky.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Z důvodu etnické, dietní a věkové různorodosti nemusí tyto referenční meze odpovídat celé populaci. Rozsahy sledování, uvedené níže, jsou pouze orientační, a neodpovídají nutně rozsahům, které budou pozorovány v dané oblasti.

Soupravou UniQ PINP RIA byly stanoveny hodnoty sérových hladin PINP u zjevně zdravých dospělých Finů bílé pleti. K výpočtu referenčních intervalů pro dolní a horní meze bylo použito neparametrické metody doporučené IFCC.³¹

Každá laboratoř by si měla stanovit své vlastní rozmezí očekávaných hodnot pro místní populaci.

Tabulka 2 Referenční hodnoty koncentrací PINP v séru

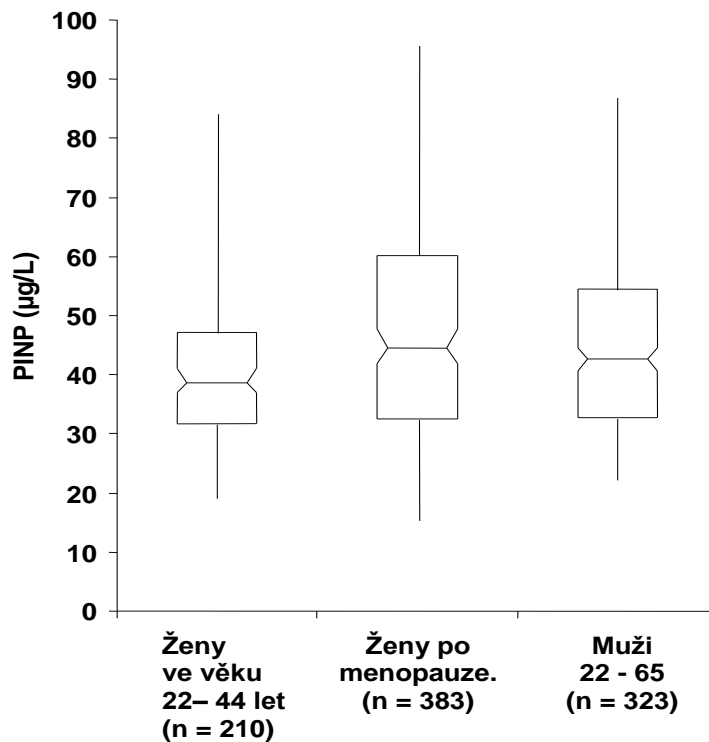
	Ženy	Ženy po menopauze*	Muži
Věk, roky	25 – 44	52 - 62	22 - 65
Počet sledovaných osob	210	383	323
Průměr	42 µg/l	48 µg/l	45 µg/l
Medián	39 µg/l	45 µg/l	43 µg/l
Referenční interval**	19 – 83 µg/l	16 – 96 µg/l	22 – 87 µg/l
0,95 -intervaly spolehlivosti	14 – 23 µg/l	15 – 19 µg/l	20 – 25 µg/l
pro dolní referenční mez	71 – 96 µg/l	87 – 103 µg/l	77 – 94 µg/l
pro horní referenční mez			

* Min. 3 roky po menopauze

** Referenční interval = 0,025 a 0,975 fraktílů.

Obrázek 2

Grafické znázornění rozdělení koncentrací PINP u zdravých dospělých jedinců. Horizontální linie v každém rámečku představuje hodnotu mediánu, zatímco spodní a horní meze rámečků představují interkvartilní rozsahy, t.j. hodnoty 25% nad a pod hodnotou mediánu. Konce čar představují meze referenčního rozsahu (fraktály 0,025 a 0,975).



Výsledky uvedené výše ukazují, že koncentrace PINP v populaci žen po menopauze jsou zvýšené ve srovnání s koncentracemi u žen ve věku 25 – 44 let ($p = 0,0005$, Mann Whitney). Tento vzrůst koncentrace PINP odráží vzrůst remodelace kosti spojený s nedostatkem estrogenu u postmenopauzální populace ve srovnání s mladší populací. Nicméně dochází ke značnému překrývání v koncentracích PINP u obou populací.

KLINICKÉ STUDIE

Léčba bisfosfonáty

Prospěšnost soupravy UniQ PINP RIA ke sledování změn remodelace kosti v průběhu léčby bisfosfonáty (denně 10 mg alendronátu) byla studována multicentrickou, prospektivní studií, dvojitě zaslepenou s placebem na populaci postmenopauzálních žen z různých míst v USA, u kterých byla diagnostikována osteoporóza a které byly alespoň 5 let po menopauze.³² Data byla získána od 124 pacientek náhodně rozdělených do dvou skupin: 62 bylo léčeno (TRM) a 62 dostávalo placebo (CTR). Všechny studované subjekty dostávaly denně suplementaci vápníkem 500 mg/d. Pacientky byly analyzovány na počátku a po 3, 6 a 12 měsících léčení. Minerální hustota kosti (BMD) byla měřena rentgenovou absorpcí (DXA) a intaktní PINP byl měřen soupravou UniQ PINP RIA.

Získaná data jsou uvedena v tabulce 3 a na obrázku 3. Na počátku sledování byla BMD $0.740 \pm 0.083 \text{ g/cm}^2$ (průměr \pm SD) u skupiny CTR a $0.727 \pm 0.104 \text{ g/cm}^2$ u skupiny TRM. U skupiny TRM za 12 měsíců průměrná BMD vzrostla o 6.0 % ze základní hodnoty. Změna byla významná ve všech sledovaných časových obdobích ve srovnání se základní hodnotou ($p < 0.0001$). Vzrůst u skupiny CTR byl za 12 měsíců menší a přechodně se vracel na základní hodnotu.

Základní koncentrace PINP byla $62.5 \pm 18.5 \text{ } \mu\text{g/l}$ u skupiny CTR a $61.1 \pm 30.1 \text{ } \mu\text{g/l}$ u skupiny TRM. Průměrná koncentrace PINP u skupiny TRM poklesla o 70.8 % za 12 měsíců léčby. Pokles byl významný u všech tří časových bodů ve srovnání se základní hodnotou ($p < 0.0001$). Pokles u skupiny CTR, která také dostávala vápníkový doplněk, byl menší a dosáhl za 12 měsíců 9.8 %.

Pozorované změny BMP a PINP v průběhu léčby bisfosfonáty odrážejí vliv, který má tato léčba na remodelaci kostí. Výsledky byly podle očekávání

a podobné dřívějším pozorováním, která ukazovala značný pokles hladin PINP během léčby bisfosfonáty.^{11, 33-34}

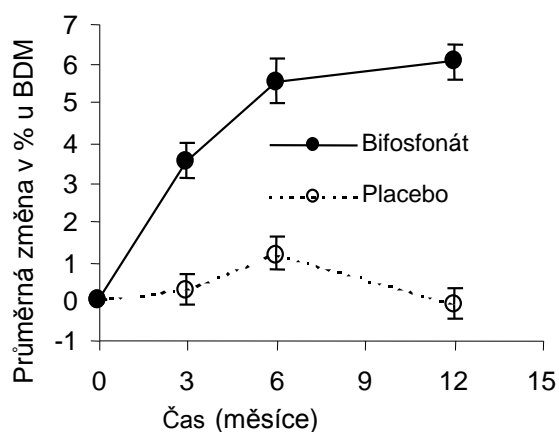
Tabulka 3 Odezva jako průměrné procento změny BMD a PINP u pacientek, kterým byly podávány bisfosfonáty nebo placebo.

Test	Léččná skupina	Průměrné procento změny (σ) od základní hodnoty		
		3 měsíce	6 měsíců	12 měsíců
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	-0.1 (3.2)
	Bisfosfonát	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	-8.6 (25.9)	-14.0 (25.5)	-9.8 (27.4)
	Bisfosfonát	-55.4 (34.0)	-71.6 (15.6)	-70.8 (15.5)

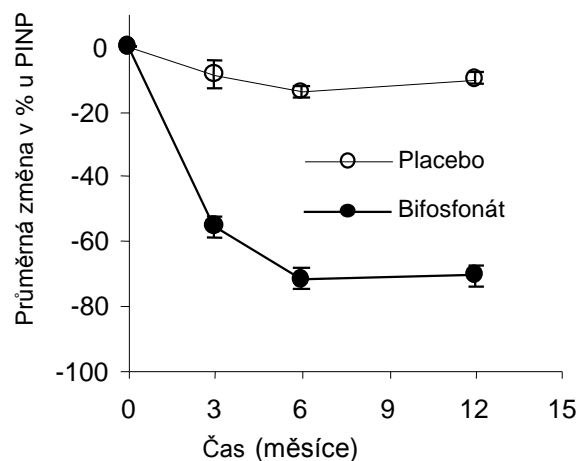
Obrázek 3

Odezva jako průměrné procento změny BMD (úsečky \pm SE) v (A) a (B) koncentrace PINP u pacientek užívajících bisfosfonát (●) nebo placebo (○).

A



B



Aby bylo dosaženo klinické významnosti, musí procento změny mezi dvěma stanoveními převýšit jak analytické (CV_a), tak intra-individuální (CV_i) kolísání. Tento práh je definován jako minimální procento změny a může být vypočten následovně:

$$\text{Minimální procento změny} = \sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV_i^2 + CV_a^2)}$$

V literatuře bylo pro PINP publikováno několik hodnot, např. Hannon a kol.¹² uvedli jako minimální procento změny pro PINP 21%.

Hormonální substituční léčba

Schopnost soupravy UniQ PINP RIA reagovat na změny při remodelaci kostí v průběhu hormonální substituční léčby (HRT) u žen po menopauze byla sledována ve studii zkoumající optimální dávkování³⁵⁻³⁶. Studované subjekty byly zjevně zdravé finské ženy alespoň tři roky po menopauze. K dispozici byla data od 44 žen, léčených po zlomenině paže, které dostávaly nejnižší léčebné dávky: denně orálně 1 mg valerátu estradiolu a orálně 2,5 mg acetátu medroxyprogesteronu. Pacientky byly analyzovány na počátku léčení a po 6 a 12 měsících. BMD byla měřena rentgenovou absorpcí (DXA) a intaktní PINP byl měřen soupravou UniQ PINP RIA.

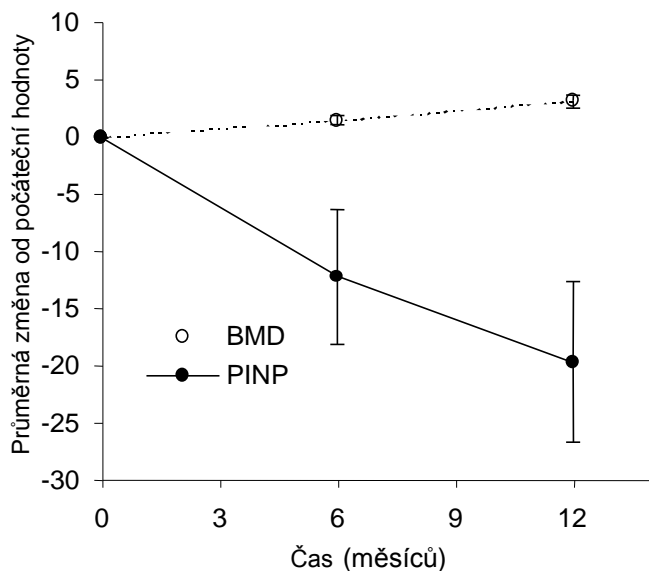
Data jsou uvedena v tabulce 4 a na obrázku 4. Na počátku byla hodnota BMD $1.083 \pm 0.182 \text{ g/cm}^2$ (průměr \pm SD) a koncentrace PINP $42.2 \pm 15.3 \text{ } \mu\text{g/l}$. Za 6 měsíců BMD vzrostla průměrně o 1.4 % a za 12 měsíců byl pozorován vzrůst o 3.1 % od počáteční hodnoty. PINP poklesl za 6 měsíců o 12,3% od základní hodnoty a za 12 měsíců o 19.8 %. Změny BMD a PINP byly významné ($p < 0.002$) jak po 6, tak po 12 měsících ve srovnání s hodnotou při započítí léčby.

Změny, pozorované v této studii u BMD a intaktního PINP v průběhu HRT, odrážely vliv této léčby na remodelaci kosti dokonce i při nízkých léčebných dávkách. Výsledky dopadly podle očekávání a byly podobné dřívějším pozorováním, která ukazovala značný pokles hladin PINP během různých typů hormonální substituční léčby.^{12-13, 15}

Tabulka 4 Odezva jako průměrné procento změny BMD a koncentrace PINP u žen po menopauze podrobených nízkým dávkám kombinované hormonální substituční léčby.

Test	Průměrné procento změny (SD) od počáteční hodnoty	
	6 měsíců	12 měsíců
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Obrázek 4 Odezva jako průměrné procento změny (úsečky \pm SE) BMD (\circ) a koncentrace PINP (\bullet) u žen po menopauze podrobených nízkým dávkám kombinované hormonální substituční léčby.



Léčba teriparatidem

Teriparatid, rekombinantní lidský parathormon [PTH] (resp. část jeho řetězce 1-34) stimuluje tvorbu kosti. Schopnost testu UniQ PINP RIA reflektovat změny v kostní remodelaci po podání teriparatidu v léčbě osteoporózy byla studována na 19 klinických pracovištích ve studii s randomizovaným, dvojitě slepým uspořádáním.³⁷ Studie se zúčastnily ambulantně léčené postmenopauzální ženy s diagnostikovanou osteoporózou minimálně pět let po menopauze. Podskupina pacientek užívala po celou dobu studie 20 µg teriparatidu v dávce jednou denně s každodenní suplementací kalcia (1000 mg) a vitamínu D (400-800 IU). Data byla sebrána od 62 pacientek ve věku $64,9 \pm 7,8$ let (průměr \pm SD) užívajících teriparatid, pro které byla k dispozici úplná sada výsledků BMD a PINP v plánovaných časových bodech odběru. BMD lumbální páteře (L1-L4) byla měřena u všech pacientek pomocí DXA za požití denzitometrů Lunar nebo Hologic na počátku studie (baseline) a po 3, 6, 12 a 18 měsících léčby teriparatidem. Koncentrace intaktního PINP byla měřena na počátku studie a po 1, 3, 6 a 12 měsících léčby pomocí testu UniQ PINP RIA.

Léčba teriparatidem vedla k nárůstu průměrných hodnot BMD během celé studie, přičemž tento nárůst byl statisticky signifikantní ve všech časových bodech ($p < 0,0001$) v porovnání s počátečním stavem (baseline). Průměrná hodnota BMD se zvýšila o $0,025 \text{ g/cm}^2$ po 3 měsících, o $0,039 \text{ g/cm}^2$ po 6 měsících, o $0,061 \text{ g/cm}^2$ po 12 měsících a o $0,079 \text{ g/cm}^2$ po 18 měsících.

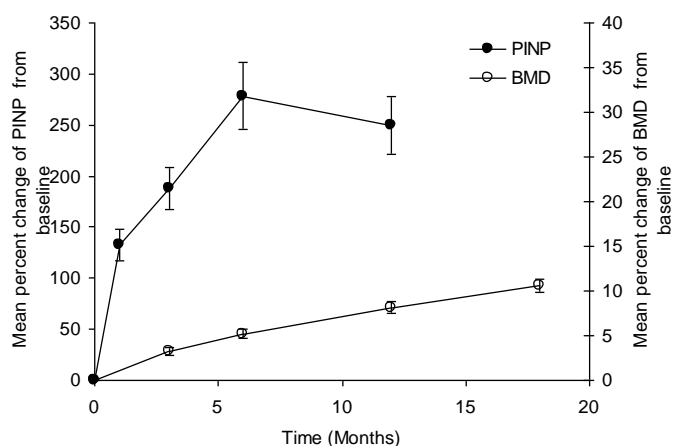
Průměrná koncentrace PINP se v porovnání s počáteční (baseline) hodnotou zvýšila o 59 µg/l po 1 měsíci, o 82 µg/l po 3 měsících, o 117 µg/l po 6 měsících a o 103 µg/l po 12 měsících. Nárůst koncentrace PINP v porovnání s počátečním stavem (baseline) byl statisticky signifikantní ve všech časových bodech ($p < 0,0001$).

V každém časovém bodě byla vypočítána procentuální změna v porovnání s počáteční hodnotou pro BMD a PINP. Průměrné procentuální změny jsou uvedeny v tabulce 5 a graficky znázorněny na obrázku 5. Průměrné hodnoty pro PINP a BMD se zvýšily v reakci na léčbu teriparatidem. Koncentrace PINP dosáhla vrcholu po 6 měsících a byla následována mírným poklesem po 12 měsících v porovnání s hodnotou po 6 měsících. Průměrná hodnota BMD se zvýšila v reakci na léčbu, a maximální hodnota byla pozorována na konci studijní periody.

Tabulka 5 Odpověď jako procentuální změna (\pm SD) BMD a koncentrace PINP u 62 postmenopauzálních žen s osteoporózou užívajících teriparatid v dávce 20 μ g jednou denně.

Test	Změna (střední hodnota \pm SD)	Změna (střední hodnota \pm SD)	Změna (střední hodnota \pm SD)	Změna (střední hodnota \pm SD)	Změna (střední hodnota \pm SD)
	1 měsíc	3 měsíce	6 měsíců	12 měsíců	18 měsíců
BMD	NA	3.3 \pm 3.4%	5.2 \pm 3.8%	8.1 \pm 5.1%	10.6 \pm 5.6%
PINP	132.6 \pm 118.2%	187.8 \pm 164.2%	278.5 \pm 257.1%	249.5 \pm 221.7%	NA

Obrázek 5 Odpověď jako průměrná procentuální změna (\pm SE) BMD a koncentrace PINP u 62 postmenopauzálních žen s osteoporózou užívajících teriparatid v dávce 20 μ g jednou denně.



Změny pozorované u BMD a koncentrace intaktního PINP odrážejí anabolický účinek terapie teriparatidem na kostní remodelaci. Tyto výsledky byly očekávány a podobají se výsledkům v jiných popisech, které prokázaly signifikantní zvýšení hladin PINP během léčby teriparatidem.¹⁷⁻²⁰ Částečně na základě stejných klinických materiálů jako ve výše uvedené studii³⁷ byl vyvinut algoritmus pro použití PINP k monitorování pacientů léčených teriparatidem, který podtrhuje klinickou vhodnost měření PINP pro léčbu postmenopauzální osteoporózy.²¹

ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

Níže uvedené výsledky byly získány v Orion Diagnostica a představují typická analytická data.

Linearita

Linearita soupravy UNIQ PINP RIA byla studována ředěním vzorků kalibrátorem 0 µg/l ze soupravy. Fáze vzestupu byla vypočtena vydělením stanovené koncentrace očekávanou koncentrací a vynásobením 100.

Tabulka 6. Linearita PINP testu

Vzorek1

Ředění	Očekávaná koncentrace (µg/l)	Průměr měření (µg/l, n = 4)	Přepočet pro neředěné (µg/l)	Fáze vzestupu (%)
neředěný	-	211.5	-	-
4:5	169.2	153.3	191.6	91
3:5	126.9	103.7	172.8	82
2:5	84.6	76.6	191.5	91
1:5	42.3	40.3	201.4	95
		Průměr	189.3	
		SD	12	
		CV%	6.3	

Vzorek 2

Ředění	Očekávaná koncentrace (µg/l)	Průměr měření (µg/l, n = 4)	Přepočet pro neředěné (µg/l)	Fáze vzestupu (%)
neředěný	-	80.9	-	-
4:5	64.7	64.5	80.6	100
3:5	48.5	48.0	79.9	99
2:5	32.4	33.0	82.4	102
1:5	16.2	15.3	76.7	95
		Průměr	79.9	
		SD	2.4	
		%CV	3	

Přesnost

Opakovatelnost (intra-assay precision) a reprodukovatelnost (inter-assay precision) soupravy byly stanoveny s použitím poolů sér a kontrolních vzorků, obsahujících různé koncentrace PINP.

Tabulka 7.

Opakovatelnost z 18 nebo 20 replikátů			Reprodukovatelnost stanovení 10 duplikátů		
Vzorek	Průměr (µg/l)	Variační koef. (%)	Vzorek	Průměr (µg/l)	Variační koef. (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Fáze vzestupu

Fáze vzestupu byla stanovena přidáním známého množství čištěného antigenu PINP ke vzorku, obsahujícímu 19,1 µg/l endogenního PINP. Vzorek byl stanoven v duplikátu soupravou UNIQ PINP RIA a byla vypočtena fáze vzestupu v %. Procento fáze vzestupu se rovná nárůstu koncentrace dělené přidanou koncentrací násobeno 100.

Tabulka 8.

Přídavek (µg/l)	Stanoveno (µg/l)	Nárůst (µg/l)	Fáze vzestupu (%)
-	19.1	-	-
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Specifická

Souprava UniQ PINP RIA je vysoce specifická pro intaktní trimerní formy aminokoncového propeptidu prokolagenu typu I. Monomerní degradační produkty PINP propeptidu (Col1) s nízkou molekulovou váhou jsou detekovány v nízkých koncentracích (zkřížená reakce je 2,7 %). Souprava UniQ PINP RIA nevykazuje zkřížené reakce s aminokoncovými propeptidy prokolagenu typu III (PIIINP).

Interferující látky

Sérový bilirubin s koncentrací < 400 µmol/l (< 23 mg/dl) neinterferuje se soupravou. Sérový hemoglobin do koncentrace 5 g/l (500 mg/dl) ani triglyceridy do koncentrace 30 g/l (3000 mg/dl) také neinterferují se soupravou.

Mez detekce

Mez detekce soupravy UniQ PINP RIA byla stanovena třikrát provedenou analýzou 20 replikátů kalibrátoru 0 µg/l a kalibrační křivky (4 replikáty).

Nejnižší soupravou detekovatelná koncentrace PINP < 2 µg/l a je definována jako dvojnásobek směrodatné odchylky hodnoty nulové vazby.

Měřicí rozsah

Měřicí rozsah soupravy UniQ PINP RIA je 5 - 250 µg/l.

NÁVAZNOST

Stanovovanou látku (analyt) v kalibrátorech UniQ PINP RIA lze vysledovat až k pracovním kalibrátorům výrobce, které jsou připraveny z vysoce čištěného PINP, jehož hodnota je určena za použití analýzy složení aminokyselin.

UniQ PINP RIA
Kat.č. 67034

Obsah soupravy
(REAGENCIE DOSTAČUJÍCÍ PRO 100 ZKUMAVEK)

PINP RIA tracer: PINP RIA radioindikátor
PINP RIA antiserum: PINP RIA antisérum
PINP RIA calibrators: PINP RIA kalibrátory
PINP RIA controls: PINP RIA kontroly
Procollagen separation reagent: Prokolagenová separační reagencie

Souhrn pracovního postupu
(všechny objemy jsou v µl)

	Celková aktivita	NSB	Kalibrátor	Kontroly a neznámé vzorky
Napipetujte vzorek		50	50	50
Napipetujte radioindikátor (červený)	200	200	200	200
Napipetujte antisérum (modré)			200	200
Napipetujte destilovanou/deionizovanou vodu		200		
Míchejte		x	x	x
Inkubujte 2 hodiny při 37°C		x	x	x
Napipetujte separační reagentii		500	500	500
Promíchejte		x	x	x
Inkubujte 30 min. při laboratorní teplotě		x	x	x
Centrifugujte 15 minut při 2000 g		x	x	x
Dekantujte		x	x	x
Měřte 1 min	x	x	x	x

US Patent č. 5,895,746; 6,008,325; 6,090,920; 6,093,803
JP Patent 3245052; EP Patent 738735 B1
CA 2174559, AU 707232, NO 320120

UniQ® je ochranná známka firmy Orion Diagnostica Oy.

132059-CZ07

Sídlo výrobce v ČR (zastoupení pro ČR, HU, PL a SR):

Orion Diagnostica-organizační složka
Bělohorská 57, 169 00 Praha 6
Tel. +420 233 350 533, Fax:+420 233 350 532
E-mail: orion@oriondiagnostica.cz
www.oriondiagnostica.cz