

Un essai immunoenzymatique servant à quantifier les liaisons croisées de pyridinoline (PYD) dans l'urine humaine

RÉSUMÉ

Préparation de réactif et d'échantillon

- Préparer le Conjugué Enzymatique avec Tampon Essai; le conserver à 2°C à 8°C. (7 mL de Tampon Essai froid par chaque flacon de Conjugé.)
- Diluer les Échantillons, solutions Étalon et solutions Témoin à 1/10 avec le Tampon Essai (par ex. 50 µl d'Échantillons + 450 µl Tampon Essai)

Procédure de l'essai

Ajouter **50 µL** de solution étalon, solution témoin ou échantillon dilué dans chaque puits des plaques enduites

Ajouter **100 µL** de conjugué enzymatique à chaque puits

Incuber pendant **180 ± 10 minutes** à 2°C à 8°C et dans l'obscurité

- Préparer la Solution de Substrat (30 à 60 minutes avant l'emploi) Placer un comprimé de substrat dans chaque flacon nécessaire de substrat tampon [Secouer le(s) flacon(s) énergiquement]
- Préparer le tampon de lavage 1X (Diluer 10X le concentré de lavage à 1/10 avec de l'eau dé-ionisée)

Laver à **3 reprises** avec Solution de Lavage

Ajouter **150 µL** de Solution de Substrat

Incuber pendant **60 ± 5 minutes** à 20°C à 28°C

Ajouter **100 µL** de Solution d'Arrêt

Lire la densité optique à 405 nm. Une équation d'ajustement des courbes à étalonnage quadratique doit être utilisé pour analyser les résultats

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

Le MicroVue PYD est un dosage urinaire qui fournit une mesure quantitative de l'excrétion des liaisons croisées de pyridinoline (PYD) comme indicateur de la résorption osseuse.

APERÇU ET EXPLICATION

Environ 90 % de la matrice osseuse organique est composée de collagène de type I, une protéine à triple hélice.¹ Le collagène osseux est croisé avec des molécules spécifiques, qui lui fournissent rigidité et force. Les liaisons croisées de collagène osseux mûr de type I sont les liaisons croisées de pyridinoline (PYD) et désoxypyridinoline (DPD).^{1,2} La PYD et la DPD sont formées par l'action enzymatique de la lysyl oxydase sur l'acide aminé lysine.³ Elles sont libérées dans la circulation pendant le processus de résorption osseuse.²⁻⁵ Les liaisons croisées de pyridinoline sont excrétées non métabolisées dans l'urine, et elles ne sont nullement affectées par le régime alimentaire,⁶ ce qui les rend appropriées pour l'évaluation de la résorption.

L'os est perpétuellement sujet à un processus métabolique appelé remaniement.^{2,7} Ce dernier comprend la résorption osseuse, induite par l'action des ostéoclastes, et un processus de formation, la formation osseuse, induite par l'action des ostéoblastes.^{2,7} Le remaniement osseux est nécessaire au maintien et à la santé de l'os et il y est étroitement associé; cela signifie que la résorption et formation sont équilibrées.⁷ Dans les cas de métabolisme osseux anormaux ce processus est dissocié et, quand la résorption est supérieure à la formation, ceci entraîne une déminéralisation osseuse nette.⁷ La mesure de produits de dégradation spécifiques de la matrice osseuse fournit des données analytiques concernant le degré de métabolisme osseux.^{2,4,5}

L'ostéoporose est une maladie métabolique des os qui se caractérise par un remaniement osseux anormal. C'est une maladie systémique du squelette caractérisée par une masse osseuse basse et une altération de la microarchitecture du tissu osseux, à l'origine d'une diminution de la résistance aux fractures.⁸ Le type d'ostéoporose le plus fréquent est celui qui touche les femmes ménopausées suite à la carence en œstrogènes induite par la cessation de la fonction ovarienne.⁷ Le rétablissement des taux d'œstrogènes précédant la ménopause par le traitement de substitution empêche la déminéralisation osseuse et l'ostéoporose.⁷⁻⁹ Les œstrogènes et une classe de composés connus sous le nom de bisphosphonates sont des traitements inhibiteurs de la résorption osseuse, qui peuvent être utilisés pour prévenir la déminéralisation osseuse ou traiter l'ostéoporose.⁷⁻¹⁰ L'ostéoporose peut également résulter d'un volume maximal et inadéquat du tissu osseux atteint pendant les années de croissance, d'un déséquilibre du remaniement osseux dû à l'âge, présentant un excès de résorption significatif et un certain nombre de conditions cliniques et traitements qui induisent l'ostéopénie ou des déséquilibres du remaniement osseux.⁷ Ces derniers incluent les maladies endocriniennes telles que l'hypogonadisme, l'hyperthyroïdie, l'hyperparathyroïdisme, et l'hypercortisolisme; les maladies gastrointestinales liées à la nutrition et au métabolisme minéral; les maladies des tissus conjonctifs; le myélome multiple; l'immobilisation chronique, l'alcoolisme, usage du tabac; et le traitement chronique à l'héparine ou aux corticostéroïdes.⁷ Les autres maladies qui se caractérisent par un remaniement osseux anormal incluent la maladie de Paget et les ostéosarcomes métastatiques.³

Pour le dosage de MicroVue PYD, on a employé une technologie pour produire un anticorps monoclonal démontrant la spécificité des liaisons croisées de pyridinoline.¹¹ La spécificité de l'anticorps monoclonal utilisé dans le dosage de MicroVue PYD permet une quantification simple, pratique, reproductible et directe de la PYD et DPD dans l'urine.

PRINCIPE DU PROCÉDÉ

Le dosage de MicroVue PYD est un dosage immunoenzymatique par compétition se présentant sous forme de plaque de microtitration à puits, et qui emploie un anticorps monoclonal anti liaisons de pyridinoline pour mesurer la PYD et la DPD dans l'urine. La PYD et la DPD de l'échantillon entrent en compétition pour

l'anticorps de PYD enduit sur la plaque. La réaction est détectée à l'aide d'un substrat pNPP. Les résultats de MicroVue PYD sont corrigés pour la concentration urinaire en créatinine.

RÉACTIFS ET MATÉRIAUX FOURNIS

96 dosages pour liaisons croisées de pyridinoline

L'EIA de MicroVue PYD contient les éléments suivants:

A	Solutions étalon de pyridinoline	Articles 4251-4256	de 0,3 mL chacun
B	(A = 0, B = 15, C = 40, E = 250, E = 100, F = 750 nmol/L de PYD)		
C	PYD d'urine humaine purifiée dans 10 mmol/L d'acide phosphorique contenant de l'azoture de sodium		
D	(0,05 %) comme conservateur		
E			
F			
L	Solutions témoin à concentration faibles	Articles 4257	de 0,3 mL chacun
	PYD d'urine humaine purifiée dans 10 mmol/L d'acide phosphorique contenant de l'azoture de sodium (0,05 %) comme conservateur		
H	Solutions témoin à concentration élevée	Articles 4258	de 0,3 mL chacun
	PYD d'urine humaine purifiée dans 10 mmol/L d'acide phosphorique contenant de l'azoture de sodium (0,05 %) comme conservateur		
1	Plaques enduites	Article 4668	12 chacun
	PYD purifiée d'os bovin, absorbée par les puits de la microplaque		
2	Solution d'arrêt	Article 4702	15 mL
	NaOH 0,5N		
3	Tampon de lavage X10	Article 4703	55 mL
	Détergent non-ionique dans une solution tampon contenant de l'azoture de sodium (0,05 %) comme conservateur		
4	Tampon d'essai	Article 4704	55 mL
	Détergent non-ionique dans une solution tampon contenant de l'azoture de sodium (0,05 %) comme conservateur		
5	Substrat tampon	Article 4705	3 x 10 mL
	Une solution de diéthanolamine et chlorure de magnésium contenant de l'azoture de sodium (0,05 %) comme conservateur		
6	Substrat en comprimés	Article 0012	3 x 20 mg
	p-Nitrophényl phosphate		
7	Conjugué enzymatique	Article 4250	3 chacun
	Anticorps monoclonal de souris anti liaisons croisées de pyridinoline, conjugué à la phosphatase alcaline contenant des sels tampons et des stabilisants		
	Couvercle adhésif de plaque	Article 0047	3 chacun

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES NON FOURNIS

- Micropipettes pour l'injection de 50 µL à 300 µL
- Éléments appropriés à la mesure de 7 mL à 300 mL de liquide
- Récipient pour dilution de tampon de lavage
- Tubes pour dilution d'échantillons, de solutions étalon et témoin
- Eau dé-ionisée ou distillée
- Lecteur de plaque capable de lire à 405 nm
- Logiciel avec ajustement des courbes à étalonnage en 4 dimensions
- Valeurs de la créatinine (mmol/L) pour les prélèvements d'urine

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Pour diagnostic *in vitro*.
- Traiter les prélèvements d'échantillons comme du matériel potentiellement nocif. Suivre les précautions standard lors de la manipulation du contenu de ce trousseau et de tous échantillons de patients.
- Utiliser les réactifs fournis intégralement avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette de l'emballage.
- Suivre les recommandations concernant la conservation des réactifs de l'essai .
- Ne pas utiliser les plaques enduites si la poche est percée.
- Tester chaque échantillon en double.
- Le NaOH 0,5N est considéré corrosif et peut provoquer une irritation de la peau. Ne pas ingérer. Eviter le contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. En cas de contact, laver à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
- L'azoture de sodium est utilisé comme conservateur. Un contact accidentel ou une ingestion de tampons contenant de l'azoture de sodium peut provoquer une irritation de la peau, des yeux, ou de la bouche. Utiliser les tampons uniquement à des fins prévues et éviter le contact avec les acides. L'azoture de sodium peut réagir avec les conduites en plomb et en cuivre pour former des azides métalliques très explosifs. Lors de la mise au rebut, rincer à grande eau pour éviter une accumulation d'azoture.
- Le tampon de substrat contient du 2,2'-iminodiéthanol et peut causer des irritations aux yeux et/ou sur la peau en cas de contact prolongé. Les zones ayant été en contact avec le produit doivent être rincées immédiatement à l'eau et au savon.
- Les solutions étalon et témoin sont dans 10 mmol/L d'acide phosphorique. Eviter le contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. Ne pas ingérer. En cas de contact, laver à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
- L'utilisation de pipettes multi-canaux ou de robots pippeteurs est recommandée pour assurer la livraison rapide des réactifs.
- Pour une mesure exacte des échantillons, ajouter les échantillons et les solutions étalon avec précision. Pipetter avec soin, en utilisant uniquement un équipement étalonné.
- Ne pas réutiliser un micropuits pour un deuxième test.
- Le non-respect des durées et températures d'incubation indiquées dans la *PROCÉDÉ DE L'ESSAI* est susceptible de provoquer des résultats erronés.
- Les solutions étalon, solutions témoin, plaques enduites et échantillons d'urine de pyridinoline sont sensibles à la lumière. Eviter une exposition prolongée à la lumière, en particulier les rayons de soleil directs ou indirects. Conserver les réactifs dans l'obscurité lorsqu'ils ne sont pas utilisés. Les échantillons et les réactifs ne sont pas considérablement affectés par la lumière normale, artificielle de laboratoire, lorsqu'ils sont manipulés conformément aux instructions du *PROCÉDÉ DE L'ESSAI*.
- Ne pas laisser sécher les micropuits quand l'essai est commencé.
- Ne pas gratter ni toucher le fond des puits lors de l'élimination du liquide hors des micropuits.
- Utiliser un flacon de lavage ou un dispositif de remplissage automatique pour laver la plaque (*PROCÉDÉ DE L'ESSAI*, étape 8). Pour obtenir des résultats optimaux, ne pas utiliser de pipette multi-canaux pour laver la microplaque.
- Cet essai a été validé pour un lavage à la main.
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Éliminer les contenants et les contenus non utilisés conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette trousse.
- Lavez-vous soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, veuillez vous référer à la Fiche de données de sécurité (FDS) que vous trouverez sur quidel.com.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Tampon de lavage

Se référer aux notes de la section **PROCÉDÉ DU DOSAGE**

Préparer la quantité nécessaire de tampon de lavage 1X (voir tableau de la section **PROCÉDÉ DU DOSAGE**) en diluant 10X le concentré de lavage à 1/10 avec de l'eau dé-ionisée. Conserver entre 20°C à 28°C. Utiliser le tampon de lavage 1X dans les 21 jours de préparation.

Instructions de lavage spéciales: Préparer un tampon de lavage 1X comme décrit ci dessus, et le conserver à 2°C à 8°C jusqu'à son utilisation.

Conjugué enzymatique

Préparer le conjugué enzymatique dans un délai de 2 heures d'utilisation. Reconstituer chaque flacon de conjugué enzymatique nécessaire (voir tableau) avec 7 mL de tampon essai froid. Conserver le conjugué enzymatique reconstitué à 2°C à 8°C jusqu'à son utilisation.

Solution de substrat active

Porter le substrat tampon à une température de 20°C à 28°C avant de commencer l'essai (deux heures à une nuit recommandées). Préparer la solution de substrat active dans un délai d'une heure d'utilisation. Placer un comprimé de substrat dans chaque flacon nécessaire de substrat tampon à 20°C à 28°C (voir tableau). Attendre 30 à 60 minutes jusqu'à dissolution du(des) comprimé(s). Secouer le(s) flacon(s) énergiquement pour mélanger complètement.

CONSERVATION

Conserver le trousseau à une température de 2°C à 8°C.

Conserver les réactifs inutilisés à une température de 2°C à 8°C.

Conserver le tampon de lavage 1X (dilué 10X) à une température comprise entre 20°C et 28°C.

PRÉLÈVEMENT DE SPÉCIMENS ET CONSERVATION

Le dosage de MicroVue PYD peut être effectué à l'aide de prélèvements d'urine sans conservateur à la première miction du matin ou à la seconde miction du matin. Les prélèvements diachroniques (par. ex. lors de l'évaluation des changements de la résorption) doivent se faire à la même heure environ chaque jour. Conserver l'échantillon d'urine réfrigéré (2°C à 8°C) et le mettre à l'abri pendant moins de 7 jours, ou congeler l'échantillon à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ pour le garder plus longtemps. Ne pas soumettre les échantillons à plus de 3 cycles de congélation/ décongélation. Eviter toute exposition prolongée à la lumière, en particulier au soleil. Pendant le traitement de routine, les échantillons ne sont pas affectés par la lumière normale, artificielle de laboratoire.

PROCÉDÉ DE L'ESSAI

Lire la notice produit dans son intégralité avant de commencer l'essai.

Voir **PRÉPARATION DES RÉACTIFS** avant de poursuivre.

NOTE CONCERNANT LE PROCÉDÉ: Le dosage de MicroVue PYD est sensible aux conditions de lavage. L'étape de lavage complète doit être réalisée dans un délai **de 2 minutes**. **Si l'étape de lavage NE PEUT PAS être réalisée dans un délai de 2 minutes, suivre les *Instructions de lavage spéciales* situées aux sections **PRÉPARATION DU RÉACTIF** et **Étape du lavage**.**

Déterminer la quantité de chaque réactif nécessaire pour le nombre de plaques à utiliser.

Quantité de plaques	4	6	8	12
Quantité d'échantillons (testés en double)	8	16	24	40
Conjugué enzymatique (flacon)	1	1	2*	2*
Substrat (flacon)	1	1	2*	2*
Tampon de lavage 1X (mL)	100	150	200	300

*Lorsque plus d'un flacon ou d'une fiole est utilisé, associé les contenus et mélanger avant d'utiliser.

Incubation de l'échantillon/du conjugué enzymatique

1. Diluer les échantillons, solutions étalon et solutions témoin à 1/10 avec le tampon essai (par ex. 50 µL d'échantillon + 450 µL de tampon essai).
2. Retirer le support des puits de la plaque de microtitration et le nombre nécessaire de plaques enduites de la poche (voir tableau). S'assurer que la poche contenant toutes plaques inutilisées est complètement fermée.
3. Placer le nombre désiré de plaques enduites dans le support des puits. Libeller les plaques pour éviter de les confondre en cas de retrait accidentel du support des puits.
4. Ajouter 50 µL de solution étalon, solution témoin ou échantillon dilué dans chaque puits des plaques enduites. Cette étape doit être réalisée dans un délai de 30 minutes.
5. Préparer le conjugué enzymatique dans un délai de 2 heures d'utilisation. Reconstituer chaque flacon de conjugué enzymatique nécessaire (voir tableau) avec 7 mL (entre 2°C et 8°C) de tampon essai froid. Conserver le conjugué enzymatique reconstitué à 2°C à 8°C jusqu'à son utilisation.
6. Ajouter 100 µL de conjugué enzymatique reconstitué à chaque puits. Recouvrir les plaques avec le couvercle adhésif fourni. Incuber pendant 3 heures (\pm 10 minutes) à 2°C à 8°C. Cette incubation doit être effectuée dans l'obscurité.
7. Préparer la solution de substrat active dans un délai d'une heure d'utilisation. Placer un comprimé de substrat dans chaque flacon nécessaire de substrat tampon à 20°C à 28°C (voir tableau). Attendre 30 à 60 minutes jusqu'à dissolution du(des) comprimé(s). Secouer le(s) flacon(s) énergiquement pour mélanger complètement.

Etape du lavage

8. Préparer la quantité nécessaire de tampon de lavage 1X (voir tableau) en diluant 10X le tampon de lavage à 1/10 avec de l'eau dé-ionisée. Inverser/vider manuellement les plaques (de l'étape 6). Ajouter au moins 250 µL de tampon de lavage 1X à chaque puits, et inverser/vider manuellement les plaques. Répéter cette opération deux fois de plus pour arriver à un total de trois lavages. Décanter énergiquement les plaques à sec sur des serviettes en papier après le dernier lavage. Pendant que les plaques sont à l'envers, nettoyer soigneusement le fond des plaques avec un essuie-tout non pelucheux pour s'assurer que le fond des plaques est propre.

Instructions de lavage spéciales: Effectuer l'étape du lavage selon la procédure décrite ci-dessus, en utilisant un tampon de lavage 1X froid (2°C à 8°C). Après chaque lavage, laisser les plaques sécher pendant 5 à 10 minutes sur des serviettes en papier avant d'ajouter le substrat.

Incubation du substrat

9. Ajouter 150 µL de solution de substrat active à chaque puits.
10. Incuber pendant 60 minutes (\pm 5 minutes) à 20°C à 28°C.
NOTE: Si la température ambiante ne peut pas être maintenue entre 20°C à 28°C et qu'une absorbance de > 2,0 n'est pas compatible avec votre lecteur de plaque, surveiller la formation de substrats dans les puits A de la solution étalon; arrêter la réaction quand la densité optique atteint 1,2 à 1,5; puis lire les plaques.

Arrêt/Lecture

11. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt à chaque puits. Ajouter la solution d'arrêt selon le même modèle et les mêmes intervalles de temps que pour l'ajout de la solution de substrat.
12. Lire la densité optique à 405 nm. S'assurer qu'aucunes grosses bulles ne sont présentes dans les puits et que les fonds des plaques sont propres. Les plaques doivent être lues dans les **15 minutes** suivant l'ajout de la solution d'arrêt.
13. Utiliser un logiciel de quantification avec une équation d'ajustement des courbes à étalonnage quadratique pour analyser les résultats du dosage de MicroVue PYD.

$$\text{Équation: } y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$$

14. Déterminer la concentration d'échantillons et de solutions témoins à partir de la courbe de concordance.
 - a. Diluer les échantillons supérieurs à 750 nmol/L dans le tampon essai et tester à nouveau. Inclure le facteur de dilution dans le calcul final.
 - b. Les valeurs de contrôle doivent être situées dans la plage spécifiée dans le certificat d'analyse fourni avec le trousseau.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le certificat d'analyse compris dans ce trousseau est spécialement conçu pour le lot, et doit être utilisé pour vérifier que les résultats obtenus par votre laboratoire sont semblables à ceux obtenus à Quidel. Les valeurs de densité optique sont fournies, et elles doivent être utilisées comme référence uniquement. Les résultats obtenus par votre laboratoire peuvent être différents.

Les plages de contrôle de qualité sont fournies. Les valeurs de contrôle sont destinées à vérifier la validité du tracé et les résultats de l'échantillon. Chaque laboratoire devrait établir ces propres paramètres en matière de limites d'essais acceptables. Si les valeurs de contrôle ne sont PAS dans les limites d'acceptation de votre laboratoire, résultats de l'essai doivent être remis en question, et les prélèvements recommencés.

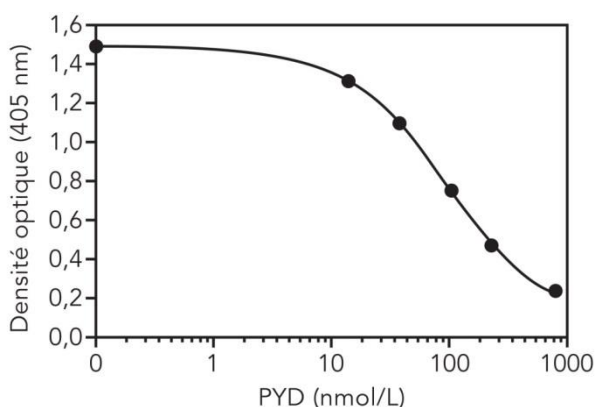
Si la densité optique de la solution étalon de MicroVue PYD est inférieure à 0,8, les résultats doivent être remis en question, et les prélèvements recommencés.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus à partir du dosage de MicroVue PYD doivent être corrigés pour les variations en concentration urinaire en divisant la valeur de liaisons de pyridinoline (nmol/L) par la valeur de la créatinine (mmol/L) de chaque échantillon (créatinine en mg/dL x 0,088 = mmol/L). Les résultats finaux de MicroVue PYD sont exprimés comme nmol de PYD & DPD/mmol de créatinine.

Courbe de concordance représentative

Taux standard de PYD: 0, 15, 40, 100, 250, 750 nmol/L



LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

Même si la MicroVue PYD est utilisée comme indicateur de la résorption du collagène de type I, du collagène osseux en particulier, l'utilité de ce test n'a pas été établie, et ne permet donc pas de prédire quelle sera l'évolution de l'ostéoporose ou le risque futur de fractures. L'utilité de ce test n'a pas été établie pour la ménopause, la maladie de Paget, l'hyperparathyroïdisme primaire ou l'hyperthyroïdie. Les résultats peuvent être déconcertants chez les patients affligés par des pathologies cliniques connues pour affecter la résorption osseuse, par ex. les ostéosarcomes, en plus des maladies et pathologies énumérées ci-dessus. Les résultats de MicroVue PYD doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques et autres résultats de diagnostic.

VALEURS D'ÉCHANTILLON

Des plages de référence de MicroVue PYD ont été établies pour des hommes (n = 118) et des femmes non ménopausées en bonne santé (n = 301) de plus de 25 ans. Dans l'optique d'établir des plages de référence, les sujets normaux furent définis comme:

- Fondamentalement sains, pas de troubles osseux, endocriniens, ou chroniques
- Cycles menstruels réguliers (femmes)
- Pas enceinte ou allaitant (femmes)
- N'étant actuellement pas sous la prise de tout médicament connu pour affecter le métabolisme osseux (par ex. les corticostéroïdes, les analogues de la gonadolibérine, les anticonvulsivants, l'héparine, les médicaments utilisés pour traiter l'hyperthyroïdie)

Les valeurs peuvent être influencées par des facteurs tels que la faible production d'œstrogènes, un apport faible en calcium ou une activité physique limitée, ou des maladies connues pour affecter le métabolisme osseux, telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget, l'hyperparathyroïdisme, l'hyperthyroïdie et les ostéosarcomes. La carence en œstrogènes chez les femmes ménopausées peut être à l'origine d'une résorption osseuse élevée. Il est suggéré d'utiliser la plage de référence pré-ménopause pour interpréter les résultats chez les femmes ménopausées. Chaque laboratoire devrait établir sa propre plage de référence standard. Les plages sont exprimées en tant qu'intervalles de référence non paramétriques (IC de 90 %).

Sexe	Plage (nmol/mmol)	Moyenne (nmol/mmol)	Ecart type (nmol/mmol)
Femmes	16,0-37,0	25,5	7,5
Hommes	12,8-25,6	18,5	4,4

La variabilité anticipée pour un même sujet a été déterminée à partir d'échantillons d'urine prélevés sur 49 sujets en bonne santé (26 femmes non ménopausées et 23 hommes) pendant cinq jours non consécutifs, sur deux semaines. La moyenne de la variation longitudinale individuelle d'un sujet était de 15 %. La variabilité entre sujets se traduit par les intervalles de référence non paramétriques indiqués ci-dessus.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Spécifications anticorps

L'anticorps monoclonal anti liaisons croisées de pyridinine présente de fortes affinités sélectives, pour la PYD et la DPD libre, et les liaisons négligeables aux peptides de PYD et DPD.

	% de réactivité
PYD libre	100 %
DPD libre	100 %
Peptides de PYD/DPD \geq 1000 MW	< 2,5 %

Sensibilité

La limite de détection minimale du dosage de MicroVue PYD est de 7,5 nmol/L, et elle est déterminée par la limite supérieure de 3 écarts type d'un essai de précision utilisant zéro comme étalon.

Récupération – Récupération maximale

La récupération maximale a été déterminée par l'ajout d'une quantité connue de PYD purifiée aux prélèvements d'urine à différents taux de PYD d'origine endogène. Des résultats types sont fournis ci-dessous.

Echantillon	Endogène (nmol/L)	Ajouté (nmol/L)	Observé (nmol/L)	Récupération (%)
1	16,7	68,2	84,1	99
2	71,0	68,2	140,8	102
3	141,0	68,2	215,5	109

Récupération – Linéarité

La linéarité a été déterminée en diluant des échantillons en série et en comparant les valeurs observées avec les valeurs anticipées. Des résultats types sont fournis ci-dessous.

Echantillon	Facteur de dilution	Observé (nmol/L)	Anticipé (nmol/L)	Récupération (%)
1	pur	261,6	–	–
	1:2	127,8	130,8	98
	1:4	59,9	65,4	92
	1:8	31,1	32,7	95
2	pur	382	–	–
	1:2	183,2	191,0	96
	1:4	90,4	95,5	95
	1:8	57,9	57,1	95
3	pur	412,3	–	–
	1:2	199,0	206,2	96
	1:4	98,2	103,1	95
	1:8	47,8	54,5	98

Précision

En cours de phase, on a déterminé la précision en testant 52 réplicats de 3 prélèvements sur 1 plaque provenant de chacun des 3 lots de kit (soit 3 plaques au total). Entre les phases, la précision a été établie par l'analyse de 3 prélèvements sur 8 plaques différentes provenant de chacun des 3 lots de kit (soit 24 plaques au total). Les échantillons ci-dessous représentent une plage de valeurs nmol/L. Pour une femme présentant un taux de créatinine de 5.0 mmol/L, les échantillons 1 à 3 représentent une résorption normale faible, normale élevée, et élevée (de 13.2 nmol/mmol, 32.0 nmol/mmol, et 81.4 nmol/mmol, respectivement).

PYD (nmol/L)	En cours de phase ¹ C.V.(%)	Entre les phase ² C.V.(%)
66	9,9	11,2
160	7,0	5,8
407	6,6	3,9

¹n = 52 ²n = 8 phases

ESSAIS CLINIQUES

Des essais cliniques ont été effectués pour évaluer les taux liaisons de pyridinine dans l'urine obtenues à l'aide du dosage MicroVue PYD. Le premier essai fut mené dans des centres de recherche clinique, à l'aide de 52 échantillons de volontaires en bonne santé et de 138 échantillons de patients présentant des troubles osseux (y compris l'ostéoporose, l'ostéoporose induite par prise de médicaments, la maladie de Paget, l'hyperparathyroïdisme et l'hyperthyroïdie). Ces maladies impliquent souvent une résorption de collagène osseux importante au moment du prélèvement de l'échantillon.

Dans l'essai, le dosage de MicroVue PYD a été comparé à une méthode de recherche par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) servant à mesurer la PYD.¹² Le seuil de CLHP, d'un essai sur 84 sujets adultes sains, s'est révélé être de 50 nmol/mmol pour les hommes et de 60 nmol/mmol pour les femmes (limite maximale de 95 % d'intervalle confiance pour chaque sexe). Cent un (101) des 138 patients, chez lesquels un trouble avait été diagnostiqué, ne présentaient pas de valeurs de PYD élevées, comme l'indique la mesure de CLHP. Les valeurs de liaisons de pyridinine MicroVue PYD des sujets en bonne santé se situaient entre 13,7 à 49,4 nmol/mmol, et variaient de 9,8 à 135,9 nmol/mmol chez les patients. En utilisant la pyridinoline élevée, déterminée par CLHP comme la méthode de classification, on a utilisé la technique de fonction d'efficacité de l'observateur pour définir une sensibilité relative optimale et spécificité au sein de la population décrite. Les sensibilité et spécificité relatives sont présentées dans le tableau 1. Un tableau d'étude comparatif de sensibilité aux hypothèses indiquant le nombre de sujets dans chaque classification figure dans le schéma 1.

Tableau 1
MicroVue PYD

Sensibilité relative	84 %
Spécificité	82 %

Schéma 1

		CLHP PYD	
		Elevée +	Non élevée -
Metra PYD	+	38	26
	-	7	119

Dans un deuxième essai, les résultats du dosage de MicroVue PYD furent comparés sur une population mixte de 39 échantillons provenant de sujets en bonne santé, et de 99 échantillons provenant de patients souffrant de la maladie de Paget. Bien que la maladie de Paget représente un modèle d'identification de la résorption active de collagène osseux, certains patients de cet essai subissaient un traitement ou étaient en rémission, et il est possible qu'il n'aient pas eu de résorption osseuse élevée au moment du prélèvement des échantillons. Dans cet essai, les sujets en bonne santé se situaient entre 12,8 à 33,2 nmol/mmol. Les patients atteints de la maladie de Paget se situaient entre 14,4 à 667,6 nmol/mmol.

En se servant du diagnostic de la maladie de Paget comme méthode de classification, on a utilisé la technique de fonction d'efficacité de l'observateur pour définir une sensibilité relative optimale et spécificité au sein de cette population. La sensibilité relative et spécificité sont indiquées dans le tableau 2. Un tableau d'étude comparatif de sensibilité aux hypothèses figure dans le schéma 2.

Tableau 2
MicroVue PYD

Sensibilité relative	89 %
Spécificité	95 %

Schéma 2

		Diagnostic de Paget	
		Oui +	Non -
Metra PYD	+	88	2
	-	11	37

ASSISTANCE

Pour des services en dehors des Etats-Unis, veuillez contacter votre distributeur local. Vous trouverez les informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site quidel.com.

RÉFÉRENCES

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 crosslinks. *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.

REF 8010 – MicroVue PYD EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PI8010001FR00 (02/17)

GLOSSAIRE

REF

Référence catalogue



Conformité Européenne

EC REP

Représentant autorisé dans
la Communauté Européenne

LOT

Référence du lot



Date d'expiration



Fabricant



Conditions de stockage



Utilisation prévue



Consulter les instructions
électroniques

IVD

Pour utilisation *in vitro*



Contenu suffisant pour 96 déterminations

CONT

Contenu

CONTROL

Contrôle
