



QUIDEL

MicroVue™ Bone PYD EIA

Enzym-Immunoassay für die Quantifizierung von Pyridinium-Crosslinks (PYD) in Humanurin

Für die *In-vitro*-Diagnostik.

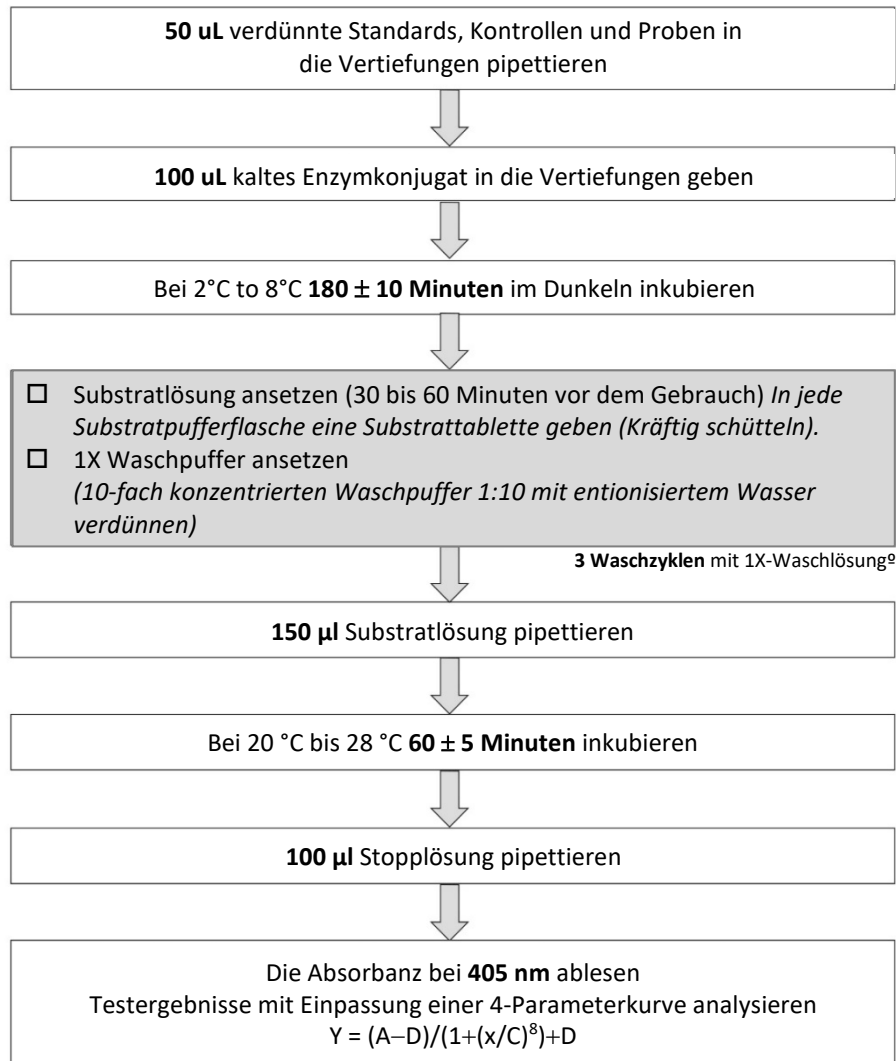
Eine Erklärung der Symbole finden Sie unter quidel.com/glossary.

ZUSAMMENFASSUNG

Ansetzen von Reagenzien, Standards und Proben

- Das Enzymkonjugat mit Testpufferlösung ansetzen; bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren (7 ml kalte Testpufferlösung für jedes Fläschchen des Enzymkonjugats hinzugeben).
- Die Standards, Kontrollen und Urinproben 1:10 mit Testpufferlösung verdünnen (50 µl Probe + 450 µl Testpuffer).

Assay-Verfahren





VERWENDUNGSZWECK

MicroVue PYD ist ein Urintest, mit dem die Ausscheidung von Pyridinium-Crosslinks – einem Indikator für die Resorption von Typ-I-Kollagen, insbesondere von Knochenkollagen – quantitativ bestimmt werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Ungefähr 90% der organischen Knochenmatrix besteht aus Kollagen vom Typ I, ein Protein in Form einer Tripelhelix.¹ Das Typ-I-Kollagen ist im Knochen mit einer Reihe spezifischer Moleküle vernetzt, die ihm eine gewissen Steifigkeit und Festigkeit verleihen. Bei den Crosslinks in Typ-I-Kollagen des Knochens handelt es sich um Pyridinium-Crosslinks, Pyridinolin (PYD) und Deoxypyridinolin (DPD).^{1,2} PYD und DPD werden durch die enzymatische Wirkung der Lysyloxidase auf die Aminosäure Lysin gebildet.³ Bei der Knochenresorption werden sie in die Zirkulation freigesetzt.²⁻⁵ Da Pyridinium-Crosslinks im nicht metabolisierten Zustand mit dem Urin ausgeschieden werden und nicht ernährungsabhängig⁶ sind, sind sie ein geeigneter Marker für die Bewertung der Resorption.

Knochen unterliegen einem als Knochengeweberemodellierung bezeichneten und kontinuierlich stattfindenden Stoffwechselfvorgang.^{2,7} Dazu gehören ein Abbauvorgang – eine durch Osteoklasten bewirkte Knochenresorption – und ein Aufbauvorgang, die durch Osteoblasten bewirkte Knochenformation.^{2,7} Die Remodellierung ist zum Erhalt der Gesamtintegrität des Knochens erforderlich und beruht auf einer genau abgestimmten Kopplung, d.h. Resorptions- und Formationsvorgänge stehen in einem Gleichgewicht zueinander.⁷ Bei einer Störung des Knochenstoffwechsels tritt dieser Prozess aus dem Gleichgewichtszustand heraus, so dass es bei einem Übergewicht an Resorption gegenüber Formationsvorgängen zu einem Gesamtverlust an Knochenmatrix kommt.⁷ Durch die Bestimmung spezifischer Abbauprodukte der Knochenmatrix werden analytische Daten über die Geschwindigkeit des Knochenstoffwechsels erhalten.^{2,4,5}

Osteoporose ist eine Knochenstoffwechselkrankheit, die durch Störungen der Knochengeweberemodellierung charakterisiert ist. Es ist eine systemische Skeletterkrankung, die von einer geringen Knochenmasse und einem mikrostrukturellen Abbau des Knochengewebes begleitet ist und somit zu einer erhöhten Frakturanfälligkeit führt.⁸ Der häufigste Typ der Osteoporose tritt bei postmenopausalen Frauen auf und wird von einem auf dem Ausbleiben der Ovarialfunktion beruhenden Östrogenmangel verursacht.⁷ Durch die Wiederherstellung der prämenopausalen Östrogenkonzentration mittels Substitutionstherapien kann ein Abbau des Knochengewebes und Osteoporose verhindert werden.⁷⁻⁹ Auf Östrogenen und den sog. Bisphosphonaten beruhende antiresorptive Therapien können zur Vermeidung von Knochenschwund oder zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt werden.⁷⁻¹⁰ Zudem kann Osteoporose ein Resultat einer inadäquaten maximalen Knochenmasse während der Wachstumsperiode sein – einem altersbedingten Ungleichgewicht der Knochengeweberemodellierung, bei dem die Resorption übermäßig stark ausgeprägt ist – und durch eine Reihe klinischer Erkrankungen und Therapien verursacht worden sein, die zu Knochenschwund oder Störungen der Knochengeweberemodellierung führen.⁷ Dazu gehören endokrine Erkrankungen wie z. B. Hypogonadismus, Hyperthyreose, Hyperparathyreoidismus, Hyperkortisolismus, ernährungsbedingte und auf dem Mineralstoffwechsel beruhende Gastrointestinalerkrankungen, Bindegewebskrankheiten, multiple Myelome, chronische Immobilisation, Alkoholismus, Tabakmissbrauch sowie chronische Heparin- und Kortikosteroidtherapien.⁷ Andere für eine gestörte Knochengeweberemodellierung charakteristische Erkrankungen sind die Paget-Krankheit und Knochenmetastasen.³

Für den MicroVue PYD Assay wurde mit Hilfe der Technologie ein monoklonaler Antikörper mit einer hohen Spezifität für Pyridinium-Crosslinks entwickelt.¹¹ Diese Spezifität des monoklonalen Antikörpers ermöglicht es, PYD und DPD in Urin auf einfache, bequeme, reproduzierbare und direkte Weise zu bestimmen.

FUNKTIONSPRINZIP

Der MicroVue PYD Assay ist ein auf Mikrotiterstreifen beruhender, kompetitiver Enzym-Immunoassay, bei dem PYD und DPD in Urin mit einem monoklonalen Antikörper gegen Pyridinium-Crosslinks bestimmt werden. Das in der Probe vorliegende PYD und DPD konkurrieren mit der PYD-Beschichtung auf dem Teststreifen um den Antikörper. Nachgewiesen wird die Reaktion mit einem pNPP-Substrat. Die mit dem MicroVue PYD Assay erhaltenen Ergebnisse sind für Urinkonzentrationen von Creatinin korrigiert.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

96 Tests auf Pyridinium-Crosslinks

Der MicroVue PYD Enzym-Immunoassay enthält folgende Komponenten:

A	Pyridinolin-Standardlösungen	Artikelnr. 4251-4256	je 0,3 ml
B	Von Humanurin isoliertes PYD in 10 mmol/l Phosphorsäure und Natriumazid (0,05%) als		
C	Konservierungsmittel		
D			
E			
F			
L	Niedrige Kontrolle	Artikelnr. 4257	je 0,3 ml
	Von Humanurin isoliertes PYD in 10 mmol/l Phosphorsäure und Natriumazid (0,05%) als		
	Konservierungsmittel		
H	Hohe Kontrolle	Artikelnr. 4258	je 0,3 ml
	Von Humanurin isoliertes PYD in 10 mmol/l Phosphorsäure und Natriumazid (0,05%) als		
	Konservierungsmittel		
1	Beschichtete Teststreifen	Artikelnr. 4668	je 12
	Von Rinderknochen isoliertes und auf die Vertiefungen der Teststreifen absorbiertes PYD		
2	Stopplösung	Artikelnr. 4702	15 ml
	0,5 N NaOH		
3	10X konzentrierter Waschpuffer	Artikelnr. 4703	55 ml
	Nicht ionisches Detergens in Pufferlösung mit Natriumazid (0,05%) als Konservierungsmittel		
4	Testpufferlösung	Artikelnr. 4704	55 ml
	Nicht ionisches Detergens in Pufferlösung mit Natriumazid (0,05%) als Konservierungsmittel		
5	Substratpuffer	Artikelnr. 4705	3 x 10 ml
	Eine Lösung aus Diethanolamin und Magnesiumchlorid mit Natriumazid (0,05%) als		
	Konservierungsmittel		
6	Substrattabletten	Artikelnr. 0012	3 x 20 mg
	p-Nitrophenylphosphat		
7	Enzymkonjugat	Artikelnr. 4250	je 3
	Lyophilisierter, monoklonaler Antikörper gegen Pyridinium-Crosslinks von Mäusen im Konjugat mit		
	alkalischer Phosphatase. Enthält Puffersalze und Stabilisatoren		
	Abdeckfolie für Mikrotiterplatten	Artikelnr. 0047	je 3

BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG)

- Mikropipetten zum Pipettieren von 50 µl bis 300 µl
- Geräte zum Abmessen von Flüssigkeiten im Volumenbereich von 7 ml bis 300 ml
- Behälter für die Waschpufferverdünnung
- Röhrchen zum Verdünnen von Proben, Standardlösungen und Kontrollen
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Plattenlesegerät für Absorbanzmessungen bei 405 nm
- Software zum Anpassen von Kalibrierkurven (4 Parameter)
- Creatininwerte (mmol/l) für Urinproben

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Zur *In-vitro*-Diagnostik
- Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Beim Arbeiten mit diesem Kit und den Proben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.
- Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
- Jede Probe als Duplikat testen.
- 0,5 N NaOH ist ätzend und kann zu Reizungen der Haut. Nicht einnehmen. Berührung mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Bei Berührung mit Wasser abwaschen. Bei Einnahme einen Arzt konsultieren.
- Natriumazid wird als Konservierungsstoff verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen, die Natriumazid enthalten, bzw. deren Einnahme kann zu Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Die Pufferlösungen nur für die vorgesehenen Verwendungszwecke einsetzen und den Kontakt mit Säuren vermeiden. Natriumazid kann beim Kontakt mit Kupfer- und Bleirohren hochexplosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen, um eine Anreicherung von Aziden zu vermeiden.
- Der Substratpuffer enthält 2,2'-Imino-diethanol und kann bei anhaltendem Kontakt Reizungen der Augen und/oder der Haut verursachen. Betroffene Bereiche nach dem Kontakt sofort mit Wasser und Seife waschen.
- Standardlösungen und Kontrollen liegen in 10 mmol/l Phosphorsäure vor. Berührung mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Nicht einnehmen. Bei Berührung mit Wasser abwaschen. Bei Einnahme einen Arzt konsultieren.
- Für ein zügiges und effizientes Dosieren von Flüssigkeiten wird der Gebrauch von Mehrkanalpipetten empfohlen.
- Zum Gewährleisten genauer Messungen bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
- Die Mikroassay-Vertiefungen jeweils nur für eine Bestimmung verwenden.
- Durch die Verwendung von Inkubationszeiten und -temperaturen, die von den unter *TESTVERFAHREN* gegebenen Werten abweichen, können falsche Ergebnisse auftreten.
- Die Pyridinolin-Standardlösungen, Kontrollen und Enzymkonjugate sind lichtempfindlich. Eine länger anhaltende Bestrahlung mit Licht, besonders mit direktem Licht oder indirekte Sonneneinstrahlung ist zu vermeiden. Die Reagenzien bei Nichtgebrauch im Dunkeln aufbewahren. Die Proben und Reagenzien werden durch normale, künstliche Laborbeleuchtung nicht signifikant beeinträchtigt, vorausgesetzt, die unter *TESTVERFAHREN* gegebenen Hinweise werden berücksichtigt.
- Die Mikroassay-Vertiefungen nach dem Start des Tests nicht austrocknen lassen.
- Beim Entfernen von Flüssigkeiten von den Mikroassay-Vertiefungen nicht den Boden der Vertiefungen ankratzen oder berühren.
- Zum Waschen der Platte eine Waschflasche oder ein automatisiertes Dosiergerät verwenden (siehe *TESTVERFAHREN*, Schritt 8). Für optimale Ergebnisse keine Mehrkanalpipette zum Waschen der Mikroassay-Platte verwenden.
- Für diesen Assay kann eine beliebige anerkannte Waschmethode eingesetzt werden.
- Testverfahren in Bereichen mit angemessener Belüftung durchführen.

- Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.
- Bei der Handhabung der Kitkomponenten geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
- Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt (SDB) auf quidel.com, um weitere Informationen zu Gefahrensymbolen, Sicherheit, Handhabung und Entsorgung der Komponenten in diesem Kit zu erhalten.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Waschpuffer

Siehe Verfahrenshinweise unter **TESTVERFAHREN**.

Das benötigte Volumen des 1X Waschpuffers (siehe Tabelle unter **TESTVERFAHREN**) vorbereiten, indem 10X konzentrierter Waschpuffer im Verhältnis 1:10 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Bei 20°C bis 28°C aufbewahren. Den 1X Waschpuffer innerhalb von 21 Tage nach dem Ansetzen verwenden.

Besondere Waschanleitung: Den 1X Waschpuffer wie oben beschrieben ansetzen und bei 2°C bis 8°C bis zum Gebrauch aufbewahren.

Enzymkonjugat

Das Enzymkonjugat innerhalb von 2 Stunden vor Gebrauch ansetzen. Alle benötigten Fläschchen des Enzymkonjugats (siehe Tabelle) mit 7 ml kalter Testpufferlösung anrühren. Das so angesetzte Enzymkonjugat bis zum Gebrauch bei 2°C bis 8°C aufbewahren.

Substratlösung

Den Substratpuffer vor dem Test auf 20°C bis 28°C bringen (zwei Stunden bis über Nacht wird empfohlen). Die Substratlösung innerhalb 1 Stunde vor dem Gebrauch ansetzen. In jede benötigte Substratpufferflasche (siehe Tabelle), die auf 20°C bis 28°C gebracht wurde, eine Substrattablette geben. Die Tablette(n) 30 bis 60 Minuten auflösen lassen. Die Flasche(n) kräftig schütteln, um eine vollständige Auflösung zu erzielen.

LAGERUNG

Den Kit bei 2°C bis 8°C aufbewahren.

Die nicht benutzten Reagenzien bei 2°C bis 8°C aufbewahren.

Den 1X Waschpuffer bei 20°C bis 28°C aufbewahren.

ENTNAHME UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Der MicroVue PYD Assay kann mit nicht konserviertem erstem oder zweitem Morgenurin durchgeführt werden. Bei Longitudinalstudien (z. B. bei der Untersuchung von Resorptionsänderungen) sollte die Probennahme jeden Tag ungefähr zur gleichen Zeit erfolgen. Die Urinprobe bis zu 7 Tage gekühlt (2°C bis 8°C) aufbewahren, darüber hinaus die Probe bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ einfrieren. Die Proben dürfen nicht mehr als dreimal eingefroren/aufgetaut werden. Eine länger anhaltende Bestrahlung mit Licht, besonders mit Sonnenlicht ist zu vermeiden. Bei normaler Behandlung werden die Proben nicht durch die normale, künstliche Laborbeleuchtung beeinträchtigt.

TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Vor dem Fortfahren die unter VORBEREITUNG DER REAGENZIEN gegebenen Informationen einsehen.

VERFAHRENSHINWEISE: Der MicroVue PYD Assay ist von den Waschbedingungen abhängig. Der **gesamte Waschschrift** sollte **innerhalb von 2 Minuten** abgeschlossen werden. **Wenn der Waschschrift NICHT innerhalb von 2 Minuten beendet werden kann, sollte man die unter VORBEREITUNG DER REAGENZIEN beschreibende BESONDERE WASCHANLEITUNG mit kalten Waschpuffer verwenden.**

Die Volumina der verschiedenen Reagenzien bestimmen, die für eine bestimmte Anzahl von Teststreifen benötigt werden.

Anz. der Teststreifen	4	6	8	12
Anz. der Proben (Bestimmung in Duplikaten)	8	16	24	40
Enzymkonjugat (Fläschchen)	1	1	2*	2*
Substrat (Flasche)	1	1	2*	2*
1X-Waschpuffer (ml)	100	150	200	300

*Werden mehrere Flaschen oder Fläschchen benötigt, deren Inhalt zusammenschütten und vor dem Gebrauch mischen.

Inkubation der Probe/des Enzymkonjugats

1. Die Proben, Standardlösungen und Kontrollen im Verhältnis 1:10 mit Testpufferlösung verdünnen (z. B. 50 µL Probe + 450 µL Testpufferlösung).
2. Den Teststreifenträger und die benötigte Anzahl der beschichteten Teststreifen aus dem Beutel nehmen (siehe Tabelle). Darauf achten, dass der Beutel, sofern er ungenutzte Teststreifen enthält, wieder richtig verschlossen wird.
3. Die gewünschte Anzahl der beschichteten Teststreifen in den Teststreifenhalter legen. Die Teststreifen beschriften, damit sie nicht vertauscht werden können, sollte der Teststreifenträger unbeabsichtigt entfernt werden.
4. 50 µL verdünnte Standardlösung, Kontrolle oder Probe in alle Vertiefungen der beschichteten Teststreifen geben. Dieser Schritt sollte innerhalb von 30 Minuten abgeschlossen werden.
5. Das Enzymkonjugat innerhalb von 2 Stunden vor Gebrauch ansetzen. Alle benötigten Fläschchen des Enzymkonjugats (siehe Tabelle) mit 7 ml kalter (2°C bis 8°C) Testpufferlösung anrühren. Das so angesetzte Enzymkonjugat bis zum Gebrauch bei 2°C bis 8°C aufbewahren.
6. 100 µL des wiederhergestellten Enzymkonjugats in jede Vertiefung geben. Die Teststreifen mit dem beiliegenden Verschlussstreifen abdecken. Bei 2°C bis 8°C 3 Stunden (± 10 Minuten) inkubieren. Diese Inkubation sollte im Dunkeln erfolgen.
7. Die Substratlösung innerhalb 1 Stunde vor dem Gebrauch ansetzen. In jede benötigte Substratpufferflasche (siehe Tabelle), die auf 20°C bis 28°C gebracht wurde, eine Substrattablette geben. Die Tablette(n) 30 bis 60 Minuten auflösen lassen. Die Flasche(n) kräftig schütteln, um eine vollständige Auflösung zu erzielen.

Waschen

8. Das benötigte Volumen des 1X Waschpuffers (siehe Tabelle) vorbereiten, indem 10X konzentrierter Waschpuffer im Verhältnis 1:10 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Die Teststreifen (von Schritt 6) manuell umdrehen/entleeren. Mindestens 250 µL des 1X Waschpuffers in jede Vertiefung geben und die Teststreifen manuell umdrehen/entleeren. Diesen Vorgang zweimal wiederholen, um insgesamt dreimal zu waschen. Die Teststreifen nach dem letzten Waschschrift durch kräftiges Ausschlagen auf ein Papierhandtuch trocknen. Die umgekehrten Teststreifen unten mit einem fusselfreien Papierhandtuch vorsichtig abwischen, um sicherzustellen, dass die Unterseite der Teststreifen sauber ist.

Besondere Waschanleitung: Den Waschschrift wie oben beschrieben mit kaltem (2°C bis 8°C), 1X Waschpuffer durchführen. Die Teststreifen nach dem letzten Waschschrift 5 bis 10 Minuten auf Papierhandtüchern abtropfen lassen, bevor das Substrat zugegeben wird.

Inkubieren des Substrats

9. 150 µL der Substratlösung in jede Vertiefung geben.
10. Bei 20°C bis 28°C 60 Minuten (± 5 Minuten) inkubieren.
ANMERKUNG: Wenn die Raumtemperatur nicht auf 20°C bis 28°C gehalten werden und eine Absorbanz > 2,0 nicht mit Ihrem Plattenlesegerät gemessen werden kann, den Reaktionsverlauf des

Substrats in den Vertiefungen mit Standardlösung A verfolgen. Die Reaktion stoppen, wenn die Absorbanz Werte im Bereich von 1,2 bis 1,5 erreicht. Dann die Ergebnisse der Teststreifen ablesen.

Hinzugeben der Stopplösung und Ablesen des Ergebnisses

11. 100 µL der Stopplösung in jede Vertiefung geben. Die Zugabe der Stopplösung sollte auf die gleiche Weise und mit dem gleichen zeitlichen Ablauf erfolgen wie die Zugabe der Substratlösung.
12. Die Absorbanz bei 405 nm ablesen. Darauf achten, dass sich in den Vertiefungen keine größeren Blasen befinden und dass die Unterseiten der Teststreifen sauber sind. Die Ergebnisse sollten innerhalb von **15 Minuten** nach der Zugabe der Stopplösung abgelesen werden.
13. Zum Analysieren der MicroVue PYD Testergebnisse eine Quantifizierungssoftware zum Anpassen von Kalibrierkurven (4 Parameter) verwenden.

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

14. Die Konzentration der Proben und der Kontrollen anhand der Standardkurve bestimmen.
 - a. Proben, die zu Ergebnissen führen, die über der höchsten Standardkontrolle im Testpuffer liegen, verdünnen und erneut testen. Den Verdünnungsfaktor bei den Berechnungen berücksichtigen.
 - b. Die Kontrollwerte sollten innerhalb des Bereichs liegen, der im beiliegenden Analysezertifikat angegeben ist.

QUALITÄTSKONTROLLE

Das diesem Kit beiliegende Analysezertifikat ist Lot spezifisch und soll nachweisen, dass die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse denen von Quidel entsprechen. Die gegebenen Absorbanzwerte sollen lediglich als Richtwerte dienen. Die von Ihrem Labor erhaltenen Ergebnisse können davon abweichen.

Die im Rahmen der Qualitätskontrolle zu verwendenden Bereiche sind angegeben. Die Kontrollwerte haben die Aufgabe, die Gültigkeit der Kurve und der Probenergebnisse zu bestätigen. Jedes Labor sollte eigene Kriterien festlegen, nach denen die Testergebnisse valide sind. Wenn die Kontrollwerte nicht innerhalb der zulässigen Grenzwerte Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben wiederholt werden.

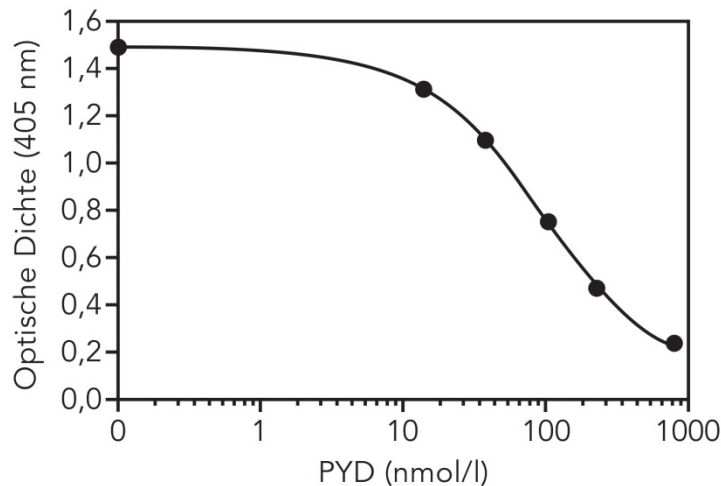
Wenn die Absorbanz der MicroVue PYD Standardlösung A unter 0,8 liegt, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben wiederholt werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die mit dem MicroVue PYD Assay erhaltenen Ergebnisse müssen für Schwankungen der Urinkonzentration korrigiert werden, indem der Wert für die Pyridinium-Crosslinks (nmol/l) jeder Probe durch den Creatininwert (mmol/l) dividiert wird (Creatinin mg/dl x 0,088 = mmol/l). Die endgültigen MicroVue PYD-Ergebnisse werden als „nmol PYD + DPD/mmol Creatinin“ angegeben.

Repräsentative Standardkurve

PYD-Konzentration der Standardlösungen: 0, 15, 40, 100, 250, 750 nmol/l



GRENZEN DER METHODE

Der MicroVue PYD Assay dient zwar als Indikator für die Resorption von Typ-I-Kollagen, insbesondere von Knochenkollagen, der Einsatz dieses Tests zum Prognostizieren des Osteoporoseverlaufs oder des zukünftigen Frakturrisikos ist jedoch nicht vorgesehen. Der Einsatz dieses Tests für menopausale Anwendungen, die Paget-Krankheit der Knochen, primären Hyperparathyreoidismus oder Hyperthyreose wurde noch nicht untersucht. Nicht eindeutige Ergebnisse sind beim Einsatz des Assays bei Patienten zu erwarten, die an Knochenkollagenresorption beeinflussenden Krankheiten leiden, wie z. B. Knochenmetastasen. Dies ist zusätzlich zu den oben aufgeführten Krankheiten zu berücksichtigen. Die Ergebnisse des MicroVue PYD Assays sollten im Zusammenhang mit anderen klinischen Daten und den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren ausgewertet werden.

REFERENZBEREICHE

Die Referenzbereiche des MicroVue PYD Assays wurden für gesunde Männer (n = 118) und gesunde prämenopausale Frauen (n = 301) über 25 Jahren festgelegt. Für die Bestimmung der Referenzbereiche wurden normale Probanden wie folgt definiert:

- Grundsätzlich gesund, ohne endokrine oder chronische Erkrankungen bzw. Knochenerkrankungen
- Regelmäßiger Menstruationszyklus (Frauen)
- Keine schwangeren oder stillenden (Frauen)
- Keine Medikationen, von denen bekannt ist, dass sie den Knochenstoffwechsel beeinflussen (z. B. Kortikosteroide, GnRH-Analoga, Antikonvulsiva, Heparin, Schilddrüsen-Medikationen)

Beeinflusst werden die Werte durch Faktoren wie eine geringe Östrogenproduktion, geringe Kalziumaufnahme, geringe physische Aktivität und Krankheiten, von denen bekannt ist, dass sie den Knochenstoffwechsel beeinflussen wie z. B. Osteoporose, Paget-Krankheit, Hyperparathyroidismus, Hyperthyreose und Knochenmetastasen. Ein bei postmenopausalen Frauen auftretender Östrogenmangel kann zu einer erhöhten Knochenresorption führen. Bei postmenopausalen Frauen sollte zum Auswerten der Ergebnisse der prämenopausale Referenzbereich herangezogen werden. Jedes Labor sollte einen eigenen normalen Referenzbereich festlegen. Die Bereiche sollten in Form von nicht parametrischen Referenzintervallen (90% KI) angegeben werden.

Geschlecht	Bereich (nmol/mmol)	Mittel (nmol/mmol)	SA (nmol/mmol)
Frauen	16,0 bis 37,0	25,5	7,5
Männer	12,8 bis 25,6	18,5	4,4

Die zu erwartende intraindividuelle Variabilität wurde auf der Grundlage von Urinproben ermittelt, die über zwei Wochen an fünf aufeinander folgenden Tagen von 49 gesunden Probanden (26 prämenopausale Frauen und 23 Männer) genommen wurden. Die mittlere intraindividuelle Variabilität betrug 15%. Die interindividuelle Variabilität spiegelt sich in den oben gegebenen, nicht parametrischen Referenzintervallen wieder.

LEISTUNGSMERKMALE

Antikörperspezifität

Der monoklonale Antikörper gegen Pyridinium-Crosslinks zeigt eine hohe Selektivität und Affinität für freies DPD und PYD. Die Bindungsaffinität für DPD- und PYD-Peptide ist dagegen vernachlässigbar gering.

	% Reaktivität
Freies PYD	100%
Freies DPD	100%
PYD/DPD-Peptide \geq 1000 MG	< 2,5%

Sensitivität

Die Nachweisgrenze des MicroVue PYD Assays beträgt 7,5 nmol/l und wurde im Rahmen einer Nullstandardstudie an der 3X Standardabweichung festgelegt.

Wiederfindung – Spike Wiederfindung

Die Spike-Wiederfindung (engl. „spike recovery“) wurde dadurch ermittelt, dass eine bekannte Menge gereinigtes PYD zu Serumproben mit unterschiedlichen Konzentrationen von endogenem PYD hinzugegeben wurde. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Probe	Endogen (nmol/l)	Zugabe (nmol/l)	Gefunden (nmol/l)	Wiederfindung (%)
1	16,7	68,2	84,1	99
2	71,0	68,2	140,8	102
3	141,0	68,2	215,5	109

Wiederfindung – Linearität

Die Linearität wurde ermittelt, indem eine serielle Verdünnungsreihe der Proben erstellt wurde und die gemessenen Werte mit den erwarteten Werten verglichen wurden. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Probe	Verdünnung	Gefunden (nmol/l)	Erwartet (nmol/l)	Wiederfindung (%)
1	un-verdünnt	261,6	–	–
	1:2	127,8	130,8	98
	1:4	59,9	65,4	92
	1:8	31,1	32,7	95
2	un-verdünnt	382	–	–
	1:2	183,2	191,0	96
	1:4	90,4	95,5	95
	1:8	57,9	57,1	95
3	un-verdünnt	412,3	–	–
	1:2	199,0	206,2	96
	1:4	98,2	103,1	95
	1:8	47,8	54,5	98

Präzision

Die Präzision „in der Serie“ wurde für 52 Replikate von 3 Proben auf 1 Platten von 3 verschiedenen Kitchargen (insgesamt 3 Platten) ermittelt. Die Präzision „von Serie zu Serie“ wurde durch die Bestimmung von 3 Proben auf 8 einzelnen Platten von 3 verschiedenen Kitchargen (insgesamt 24 Platten) ermittelt. Die Proben waren für den unten beschriebenen Konzentrationsbereich repräsentativ. Die Proben 1 bis 3 einer Frau mit einer Creatininkonzentration von 5,0 mmol/l stellen die Resorptionsbereiche niedrig-normal, hoch-normal, und erhöht dar (13,2 nmol/mmol, 32,0 nmol/mmol und 81,4 nmol/mmol).

PYD (nmol/l)	In der Serie ¹ (CV%)	Von Serie zu Serie ² (CV%)
66	9,9	11,2
160	7,0	5,8
407	6,6	3,9

¹n = 52 ²n = 8 Serien

KLINISCHE STUDIEN

Es wurden klinische Studien durchgeführt, um die mit dem MicroVue PYD Assay erhaltenen Werte für Pyridinium-Crosslinks zu beurteilen. Die erste dieser Studien wurden an verschiedenen klinischen Forschungseinrichtungen mit 52 Proben von gesunden Freiwilligen und 138 Proben von Patienten mit diagnostizierten Knochenkrankheiten (Osteoporose, durch Arzneimittel hervorgerufene Osteoporose, Paget-Krankheit, Hyperparathyroidismus, Hyperthyreose) durchgeführt. Diese Krankheiten sind zum Zeitpunkt der Probenahme häufig mit einer erhöhten Resorption von Knochenkollagen verbunden.

Im Rahmen der Studie wurde der MicroVue PYD Assay mit einer zu Forschungszwecken eingerichteten HPLC-Methode für die Bestimmung von Pyridinolin verglichen.¹² Der HPLC-Grenzwert lag – bestimmt in einer Studie mit 84 gesunden Erwachsenen – bei 50 nmol/mmol für Männer und 60 nmol/mmol für Frauen (geschlechtsspezifischer oberer Grenzwert mit einem Konfidenzintervall von 95%). Bei 101 der 138 Patienten mit diagnostizierter Knochenkrankheit wurden mittels HPLC keine erhöhten PYD-Werte gefunden. Die Pyridinium-Crosslink-Werte lagen bei den gesunden Probanden im Bereich von 13,7 bis 49,4 nmol/mmol und bei den Patienten im Bereich von 9,8 bis 135,9 nmol/mmol.

Mit Hilfe der ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristics) wurde für die beschriebene Population eine optimale relative Sensitivität und Spezifität festgelegt. Dabei wurden die erhöhten, mittels HPLC bestimmten PYD-Werte als Klassifizierungsmethode zugrunde gelegt. Die relative Sensitivität und Spezifität sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Anzahl der Probanden pro Klassifizierung ist in einer 2x2-Kontingenztafel in Abb. 1 veranschaulicht.

Tabelle 1
MicroVue PYD

Relative Sensitivität	84%
Spezifität	82%

Abb. 1

		HPLC PYD	
		erhöht +	nicht erhöht -
Metra PYD	+	38	26
	-	7	119

In einer zweiten Studie wurden die Ergebnisse des MicroVue PYD Assays in einer gemischten Population verglichen, die aus 39 Proben von gesunden Probanden und 99 Proben von Patienten mit der Paget-Krankheit bestand. Zwar stellt die Paget-Krankheit ein Modell für die Identifizierung aktiver Knochenkollagenresorption dar, einige an dieser Studie teilnehmende Patienten befanden sich jedoch in Behandlung oder zeigten Remissionszeichen und hatten zum Zeitpunkt der Probenahme u. U. keine erhöhte Resorption. Bei den gesunden Probanden wurden in dieser Studie Werte zwischen 12,8 und 33,2 nmol/mmol und bei Patienten der Paget-Krankheit Werte zwischen 14,4 und 667,6 nmol/mmol ermittelt.

Mit Hilfe der ROC-Analyse wurde für diese Population eine optimale relative Sensitivität und Spezifität festgelegt. Dabei wurde die Diagnose der Paget-Krankheit als Klassifizierungsmethode zugrunde gelegt. Die relative Sensitivität und Spezifität sind in Tabelle 2 aufgeführt. Abb. 2 zeigt eine 2x2-Kontingenztafel.

Tabelle 2
MicroVue PYD

Relative Sensitivität	89%
Spezifität	95%

Abb. 2

		Diagnostizierte Paget-Krankheit	
		Ja +	Nein -
Metra PYD	+	88	2
	-	11	37

KUNDENDIENST

Informationen zum Serviceangebot außerhalb der USA erhalten Sie von Ihrer Vertretung vor Ort. Zusätzliche Informationen zu Quidel, unseren Produkten und Vertretungen finden Sie auf unserer Website quidel.com.

LITERATURVERWEISE

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

1



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

PI8010003DE00 (11/19)

1

GLOSSAR

REF

Katalog-Nr.



CE-Konformitätserklärung

EC REP

Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft

LOT

Chargencode



Verwenden



Hersteller



Temperaturbegrenzung



Verwendungszweck

Rx ONLY

Verschreibungspflichtig



E-Beschriftung
Gebrauchsanweisung

IVD

Zur *In-vitro*-Diagnostik



Enthält ausreichend Material für 96 Bestimmungen

CONT

Inhalt/Enthält

CONTROL

Kontrolle
