

## Saggio immunoenzimatico per la quantizzazione dei legami crociati di piridinio (PYD) nell'urina umana

Per uso diagnostico *in vitro*

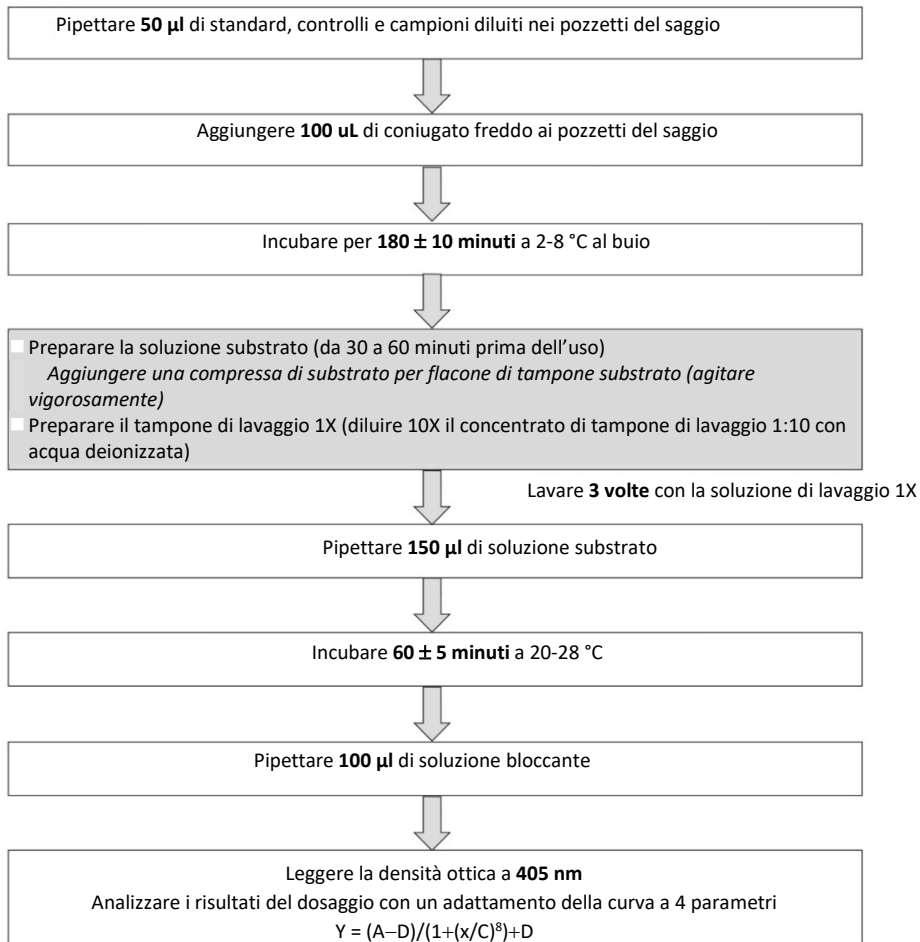
Alla pagina [quidel.com/glossary](http://quidel.com/glossary) è disponibile un glossario dei simboli.

### SOMMARIO

#### Preparazione di reagenti, standard, controlli e campioni

- Preparare il coniugato enzimatico con soluzione tampone del saggio, conservare a 2-8 °C (*aggiungere 7 ml di tampone di saggio freddo per ogni flacone di coniugato*).
- Diluire standard, controlli e campioni di urina 1:10 con soluzione tampone del saggio (50 µl di campione + 450 µl di tampone del saggio).

#### Procedura del saggio





## FINALITÀ D'USO

MicroVue PYD è un saggio urinario che fornisce una misura quantitativa dell'escrezione dei legami crociati di piridinio (PYridinium, PYD) come indicatore di riassorbimento del collagene di tipo I, specialmente del collagene osseo.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Circa il 90% della matrice organica ossea è formata da collagene di tipo I, una proteina a elica tripla.<sup>1</sup> Il collagene di tipo I delle ossa è crosslegato con molecole specifiche che forniscono rigidità e forza. I legami crociati del collagene maturo di tipo I nelle ossa sono quelli del piridinio, della piridinolina (PYD) e desossipiridinolina (DPD).<sup>1,2</sup> PYD e DPD sono formati dall'azione enzimatica della lisil-ossidasi sull'aminoacido lisina.<sup>3</sup> Essi vengono secreti in circolo durante il processo di riassorbimento osseo.<sup>2-5</sup> I legami crociati del piridinio non metabolizzati vengono espulsi nell'urina e non sono influenzati dalla dieta,<sup>6</sup> cosa che li rende idonei per la valutazione del riassorbimento.

L'osso è costantemente sottoposto a un processo metabolico denominato rimodellazione.<sup>2,7</sup> Tale processo comprende una fase di degradazione, riassorbimento dell'osso, mediato dall'azione degli osteoclasti, e una fase di generazione, formazione dell'osso, mediata dall'azione degli osteoblasti.<sup>2,7</sup> La rimodellazione è necessaria per il mantenimento, in generale per la salute dell'osso ed è strettamente abbinata; vale a dire che il riassorbimento e la formazione sono bilanciati.<sup>7</sup> In condizioni anormali del metabolismo dell'osso, questo processo non va di pari passo e quando il riassorbimento supera la formazione, si ha una perdita netta dell'osso.<sup>7</sup> La misurazione dei prodotti specifici della degradazione della matrice ossea fornisce i dati analitici del tasso di metabolismo osseo.<sup>2,4,5</sup>

L'osteoporosi è una malattia metabolica dell'osso caratterizzata da una rimodellazione anormale dell'osso. Si tratta di una malattia scheletrica sistemica, caratterizzata da minore massa ossea e deterioramento della microarchitettura del tessuto osseo, con un conseguente aumento della suscettibilità alle fratture.<sup>8</sup> Il tipo maggiormente comune di osteoporosi si verifica in donne in postmenopausa in seguito alla mancanza di estrogeni causata dalla cessazione della funzione ovarica.<sup>7</sup> Il ripristino dei livelli di estrogeno in premenopausa con una terapia sostitutiva impedisce la perdita ossea e l'osteoporosi.<sup>7-9</sup> Gli estrogeni e una classe di composti conosciuti come bisfosfonati rappresentano delle terapie anti-riassorbenti che possono essere usate per impedire la perdita ossea o per curare l'osteoporosi.<sup>7-10</sup> È possibile anche che l'osteoporosi provochi una massa ossea con picco inadeguato durante gli anni di crescita, uno squilibrio della rimodellazione dell'osso riferito all'età con un eccesso netto di riassorbimento e numerose condizioni cliniche e terapie che inducono la perdita ossea o gli squilibri della rimodellazione dell'osso.<sup>7</sup> Queste comprendono malattie endocrine quali ipogonadismo, ipertiroidismo, iperparatiroidismo, ipercortisonismo; malattie gastrointestinali riferite al metabolismo della nutrizione e minerale; malattie del tessuto connettivo; mieloma multiplo; immobilizzazione cronica, alcolismo o uso di tabacco e terapia cronica con eparina o corticosteroidi.<sup>7</sup> Altre malattie caratterizzate dalla rimodellazione anomala dell'osso comprendono il morbo di Paget e tumori metastatici dell'osso.<sup>3</sup>

Per il saggio MicroVue PYD, è stata impiegata la tecnologia allo scopo di produrre un anticorpo monoclonale che dimostri la specificità per i legami crociati del piridinio.<sup>11</sup> La specificità dell'anticorpo monoclonale usato nel saggio MicroVue PYD consente la quantificazione in modo semplice, comodo, riproducibile e diretto di PYD e DPD nell'urina.

## PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il saggio MicroVue PYD è un saggio immunoenzimatico competitivo, in formato di striscia per la microtitolazione, che utilizza un anticorpo monoclonale dei legami crociati anti-piridinio al fine di misurare il PYD e la DPD nell'urina. PYD e DPD nel campione competono per l'anticorpo con il PYD rivestito sulla striscia. La reazione viene rilevata con un substrato di pNPP. Per quanto riguarda la concentrazione urinaria, i risultati di MicroVue PYD vengono corretti con la creatinina.

## REAGENTI E MATERIALI FORNITI

### 96 saggi per legami crociati di piridinio

MicroVue PYD EIA kit contiene i seguenti materiali e reagenti:

<b>A</b>	<b>Standard di piridinolina</b>	<b>Codici 4251-4256</b>	<b>0,3 ml ciascuno</b>
<b>B</b>	PYD purificato da urina umana in acido fosforico da 10 mmol/L contenente azide di sodio (0,05%)		
<b>C</b>	come conservante		
<b>D</b>			
<b>E</b>			
<b>F</b>			
<b>L</b>	<b>Campioni di controllo inferiori</b>	<b>Codici 4257</b>	<b>0,3 ml ciascuno</b>
	PYD purificato da urina umana in acido fosforico da 10 mmol/L contenente azide di sodio (0,05%) come conservante		
<b>H</b>	<b>Campioni di controllo superiori</b>	<b>Codici 4258</b>	<b>0,3 ml ciascuno</b>
	PYD purificato da urina umana in acido fosforico da 10 mmol/L contenente azide di sodio (0,05%) come conservante		
<b>1</b>	<b>Strisce rivestite</b>	<b>Codice 4668</b>	<b>12 pezzi</b>
	PYD purificato da osso di bovino adsorbito su Stripwell		
<b>2</b>	<b>Soluzione bloccante</b>	<b>Codice 4702</b>	<b>15 ml</b>
	0,5N NaOH		
<b>3</b>	<b>Tampone di lavaggio 10X</b>	<b>Codice 4703</b>	<b>55 ml</b>
	Detergente non ionico in una soluzione tamponata contenente azide di sodio (0,05%) come conservante		
<b>4</b>	<b>Tampone saggio</b>	<b>Codice 4704</b>	<b>55 ml</b>
	Detergente non ionico in una soluzione tamponata contenente azide di sodio (0,05%) come conservante		
<b>5</b>	<b>Tampone del substrato</b>	<b>Codice 4705</b>	<b>3 x 10 ml</b>
	Soluzione di dietanolammina e cloruro di magnesio contenente azide di sodio (0,05%) come conservante		
<b>6</b>	<b>Tavolette di substrato</b>	<b>Codice 0012</b>	<b>3 x 20 mg</b>
	Fosfato di p-Nitrofenile.		
<b>7</b>	<b>Coniugato enzimatico</b>	<b>Codice 4250</b>	<b>3 pezzi</b>
	Anticorpo monoclonale dei legami crociati anti-piridinio murino liofilizzato coniugato con fosfatasi alcalina contenente sali del tampone e stabilizzatori		
	<b>Nastro copri piastra</b>	<b>Codice 0047</b>	<b>3 pezzi</b>

## MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Micropipette per la fornitura di 50 µl a 300 µl
- Elementi adatti per la misurazione di liquidi da 7 ml a 300 ml
- Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio
- Provette per la diluizione di campioni, standard e campioni di controllo
- Acqua deionizzata o distillata
- Lettore per piastra in grado leggere a 405 nm
- Software per adattamento della curva di calibrazione a quattro parametri
- Valori della creatinina (mmol/L) per i campioni di urina

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *In vitro*.
- Trattare i campioni come materiale a potenziale rischio biologico. Seguire le precauzioni generali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualunque campione paziente.
- Usare i reagenti forniti come un'unità integrale prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
- Conservare i reagenti del saggio come indicato.
- Non usare le strisce rivestite se la busta protettiva è danneggiata.
- Sottoporre a test ciascun campione in duplicato.
- 0,5N NaOH è considerato corrosivo e può causare irritazioni alla cute. Non ingerirlo. Evitare il contatto con la cute, gli occhi o gli indumenti. Se avviene il contatto, lavare con acqua. Se ingerito, consultare un medico.
- L'azide di sodio viene usato come conservante. Il contatto o l'ingestione accidentale di tamponi contenenti azide di sodio può causare irritazioni alla cute, agli occhi o alla bocca. Usare esclusivamente i tamponi per gli scopi previsti ed evitare il contatto con gli acidi. È possibile che l'azide di sodio reagisca con tubazioni in rame e in piombo e formi azidi metallici altamente esplosivi. Dopo lo smaltimento, lavare con una grande quantità di acqua per impedire l'accumulo di azide.
- Il tampone del substrato contiene dietanolamina e, in caso di contatto prolungato, può provocare irritazione agli occhi e/o alla cute. Occorre lavare immediatamente con sapone e acqua le aree entrate in contatto.
- Gli standard e i campioni di controllo si trovano in acido fosforico a 10 mmol/L. Evitare il contatto con la cute, gli occhi o gli indumenti. Non ingerirlo. Se avviene il contatto, lavare con acqua. Se ingerito, consultare un medico.
- Si consiglia l'uso di pipette multicanale o di pipettatori a ripetizione per garantire la fornitura veloce dei reagenti.
- Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere accuratamente i campioni e gli standard. Pipettare attentamente, usando esclusivamente apparecchiature calibrate.
- Non utilizzare un pozzetto per microsaggio per più di un test.
- L'impostazione di tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati nella sezione **PROCEDURA DEL SAGGIO** può fornire risultati errati.
- Gli standard di piridinolina, campioni di controllo, strisce rivestite e campioni di urina sono sensibili alla luce. Evitare l'esposizione prolungata alla luce, specialmente alla luce del sole diretta o indiretta. Quando non sono in uso, conservare i reagenti in un luogo buio. Durante la manipolazione, i campioni e i reagenti non sono influenzati in modo significativo dalla luce normale, artificiale e di laboratorio, come stabilito nelle istruzioni della **PROCEDURA DEL SAGGIO**.
- Dopo l'inizio del saggio, evitare che i pozzetti per microsaggio si asciughino.
- Quando si rimuove il liquido dai pozzetti per microsaggio, non raschiare né toccare il fondo dei pozzetti.
- Lavare la piastra utilizzando un flacone di lavaggio o un dispositivo di riempimento automatico (**PROCEDURA DEL SAGGIO**, fase 8). Per ottenere risultati ottimali, la piastra per microsaggio non deve essere lavata con una pipetta multicanale.
- Questo saggio è stato omologato per il lavaggio manuale.
- I test devono essere effettuati in un'area dotata di ventilazione adeguata.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con la normativa nazionale e locale in vigore.
- Indossare indumenti protettivi, guanti, e protezione occhio/viso durante l'utilizzo del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su [quidel.com](http://quidel.com).

## PREPARAZIONE DEI REAGENTI

### Tampone di lavaggio

Fare riferimento alla nota procedurale nella sezione **PROCEDURA DEL SAGGIO**.

Preparare la quantità necessaria di tampone di lavaggio 1X (fare riferimento alla tabella nella sezione *PROCEDURA DEL SAGGIO*) diluendo con acqua deionizzata il tampone di lavaggio concentrato in un rapporto di 1:10. Conservare a 20°C a 28°C. Utilizzare il tampone di lavaggio 1X entro 21 giorni dalla preparazione.

**Istruzioni speciali di lavaggio:** Preparare un tampone di lavaggio 1X come menzionato sopra e conservare a 2°C a 8°C fino al momento dell'utilizzo.

## Coniugato enzimatico

Preparare il coniugato enzimatico entro 2 ore dall'utilizzo. Ricostituire ciascuna fiala necessaria di coniugato enzimatico (fare riferimento alla tabella) con 7 ml di tampone del saggio freddo. Conservare il coniugato enzimatico ricostituito a 2°C a 8°C fino al momento dell'utilizzo.

## Soluzione di substrato attiva

Prima dell'inizio del saggio (si consiglia da due ore a tutta la notte). Preparare substrato attiva entro 1 ora dall'utilizzo. Porre una tavoletta di substrato in ciascun flacone necessario di tampone di substrato a 20°C a 28°C (fare riferimento alla tabella). Lasciar trascorrere 30 a 60 minuti per consentire alle tavolette di dissolversi. Agitare accuratamente i flaconi al fine di miscelarli completamente.

## CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2°C a 8°C.

Conservare i reagenti inutilizzati a 2°C a 8°C.

Conservare il tampone di lavaggio 1X (diluito 10X ) a 20°C a 28°C.

## PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

È possibile eseguire il saggio MicroVue PYD con i prelievi della prima urina del mattino (FMV) o della seconda urina del mattino (SMV), privi di conservanti. È necessario raccogliere i prelievi longitudinali (ad esempio quando si valutano i cambiamenti del riassorbimento) circa alla stessa ora di ciascuna giornata. Mantenere refrigerato il campione di urina (2°C a 8°C) per la conservazione inferiore a 7 giorni oppure congelare il campione a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  per una conservazione più lunga. Non sottoporre il campione a più di 3 cicli di congelamento/decongelamento. Evitare l'esposizione prolungata alla luce, specialmente alla luce del sole. Durante il trattamento di routine, i campioni non vengono influenzati dalla luce normale, artificiale e di laboratorio.

## PROCEDURA DEL SAGGIO

**Prima di iniziare il saggio, leggere completamente l'inserto fornito con il prodotto.**

*Prima di procedere, fare riferimento a PREPARAZIONE DEI REAGENTI.*

**NOTA PROCEDURALE:** Il saggio MicroVue PYD è sensibile alle condizioni di lavaggio. È necessario completare l'intera fase di lavaggio entro 2 minuti. Qualora fosse IMPOSSIBILE completare la fase di lavaggio entro 2 minuti, seguire le *Istruzioni speciali di lavaggio* contenute nelle sezioni *PREPARAZIONE DEL REAGENTE* e *Fase di lavaggio*.

Determinare la quantità necessaria di ciascun reagente per il numero di strisce da usare.

# di strisce	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
# di campioni (sottoposti a test in duplicato)	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>40</b>
Coniugato enzimatico (fiala)	1	1	2*	2*
Substrato (flacone)	1	1	2*	2*
Tampone di lavaggio 1X (ml)	100	150	200	300

\* Quando viene usato più di un flacone o di una fiala, unire i contenuti e miscelarli prima dell'uso.

## Incubazione del campione/coniugato enzimatico

1. Diluire i campioni, gli standard e i campioni di controllo in un rapporto di 1:10 con il tampone del saggio (ad esempio 50 µl di campione + 450 µl di tampone del saggio).
2. Rimuovere il telaio Stripwell dalla busta protettiva e il numero necessario di strisce rivestite (fare riferimento alla tabella). Verificare che la busta protettiva contenente qualunque striscia inutilizzata venga risigillata completamente.
3. Porre il numero desiderato di strisce rivestite nel telaio Stripwell. Etichettare le strisce per evitare di fare confusione nel caso di una rimozione accidentale dal telaio Stripwell.
4. Aggiungere 50 µl di standard diluito, campione di controllo o campione a ciascun pozzetto di strisce rivestite. È necessario completare questa fase entro 30 minuti.
5. Preparare il coniugato enzimatico entro 2 ore dall'utilizzo. Ricostituire ciascuna fiala necessaria di coniugato enzimatico (fare riferimento alla tabella) con 7 ml di tampone del saggio freddo (2°C a 8°C). Conservare il coniugato enzimatico ricostituito a 2°C a 8°C fino al momento dell'utilizzo.
6. Aggiungere a ciascun pozzetto 100 µl di coniugato enzimatico ricostituito. Coprire le strisce con il nastro fornito. Incubare per 3 ore (± 10 minuti) a 2°C a 8°C. È necessario eseguire tale incubazione in un luogo buio.
7. Preparare la soluzione di substrato attiva entro 1 ora dall'utilizzo. Porre una tavoletta di substrato in ciascun flacone necessario di tampone di substrato a 20°C a 28°C (fare riferimento alla tabella). Lasciar trascorrere 30 a 60 minuti per consentire alle tavolette di dissolversi. Agitare accuratamente i flaconi al fine di miscelarli completamente.

## Fase di lavaggio

8. Preparare la quantità necessaria di tampone di lavaggio 1X (fare riferimento alla tabella) diluendo con acqua deionizzata il tampone di lavaggio concentrato in un rapporto di 1:10. Capovolgere/svuotare manualmente le strisce (ved. punto 6). Aggiungere a ciascun pozzetto almeno 250 µl di tampone di lavaggio 1X e capovolgere/ svuotare le strisce. Ripetere la procedura per altre due volte, per un totale di tre lavaggi. Asciugare accuratamente le strisce su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio. Mentre le strisce sono capovolte, pulire attentamente le estremità inferiori delle strisce con carta assorbente priva di lanugine per garantire che le estremità inferiori delle strisce siano pulite.

**Istruzioni speciali di lavaggio:** Eseguire la fase di lavaggio come descritto sopra, con un tampone di lavaggio 1X freddo (2°C a 8°C). Dopo aver eseguito l'ultimo lavaggio, lasciar asciugare le strisce per 5 a 10 minuti su carta assorbente prima dell'aggiunta del substrato.

## Incubazione del substrato

9. Aggiungere a ciascun pozzetto 150 µl di soluzione attiva di substrato.
10. Incubare per 60 minuti (± 5 minuti) a 20°C a 28°C.  
**NOTA:** Se non è possibile mantenere la temperatura ambiente fra i 20°C a 28°C e un'assorbanza di > 2,0 non è compatibile con il lettore per piastra, monitorare lo sviluppo del substrato nei pozzetti standard A; bloccare la reazione quando la densità ottica raggiunge i 1,2 a 1,5; quindi leggere le strisce

## Arresto/Lettura

11. Aggiungere a ciascun pozzetto 100 µl di soluzione bloccante. Aggiungere soluzione bloccante dello stesso tipo e a intervalli di tempo uguali all'aggiunta della soluzione di substrato.
12. Leggere la densità ottica a 405 nm. Garantire che nei pozzetti non sia presente alcuna bolla grande e che le estremità inferiori delle strisce siano pulite. È necessario leggere le strisce entro **15 minuti** dall'aggiunta della soluzione bloccante.
13. Usare il software di quantizzazione con equazione di adattamento della curva di calibrazione a quattro parametri per l'analisi dei risultati del saggio MicroVue PYD.

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

14. Determinare la concentrazione dei campioni e dei campioni di controllo dalla curva standard.

- a. Diluire i campioni che producono valori maggiori del controllo standard più elevato nel tampone del saggio ed effettuare di nuovo il test. Comprendere il fattore di diluizione nel calcolo finale.
- b. È necessario che i valori del campione di controllo si trovino all'interno della gamma specifica nel certificato di analisi fornito in dotazione con il kit.

## CONTROLLO DI QUALITÀ

Il certificato di analisi compreso in questo kit è specifico per il lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal laboratorio siano simili a quelli ottenuti da Quidel. Vengono forniti valori della densità ottica che sono da usare esclusivamente come direttiva. È possibile che i risultati ottenuti dal laboratorio differiscano.

Vengono forniti i valori di gamma per il controllo di qualità. I valori di controllo sono destinati a verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri per la definizione dei limiti di accettazione del saggio. Se i valori di controllo NON sono all'interno dei limiti di accettazione del laboratorio, i risultati del saggio devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i campioni.

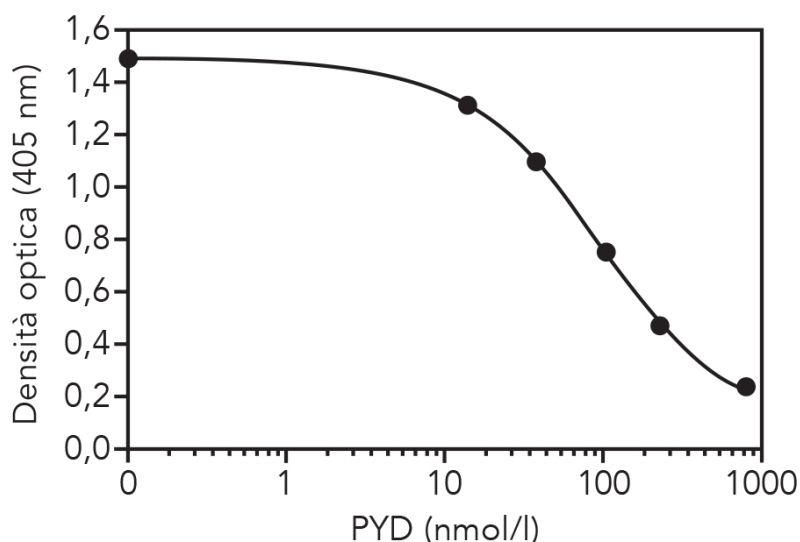
Se la densità ottica di MicroVue PYD Standard A è inferiore a 0,8, i risultati devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i campioni.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

È necessario correggere i risultati ottenuti dal saggio MicroVue PYD per le variazioni della concentrazione di urina dividendo il valore dei legami crociati del piridinio (nmol/L) per il valore della creatinina (mmol/L) di ciascun campione ( $\text{creatinina mg/dL} \times 0,088 = \text{mmol/L}$ ). I risultati finali di MicroVue PYD verranno espressi come nmol PYD e DPD/mmol creatinina.

## Curva standard rappresentativa

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



## LIMITI DELLA PROCEDURA

Mentre MicroVue PYD VIENE USATO come indicatore di riassorbimento del collagene di tipo I, specialmente collagene osseo, l'uso di tale test non è stato stabilito per prevedere lo sviluppo di osteoporosi o del rischio di fratture future. Non si è stabilito l'uso di tale test nella menopausa, nel morbo osseo di Paget e nell'iperparatiroidismo o ipertiroidismo primario. È possibile confondere i risultati in pazienti affetti da condizioni cliniche di cui sia nota l'influenza sul riassorbimento dell'osso, ad esempio

metastasi dell'osso, in aggiunta alle malattie e alle condizioni sopra elencate. I risultati di MicroVue PYD dovrebbero essere interpretati unitamente al quadro clinico e a altri risultati diagnostici.

## RISULTATI DEL CAMPIONE

I valori di riferimento di MicroVue PYD sono stati stabiliti per uomini sani (n = 118) e donne sane in premenopausa (n = 301) con oltre 25 anni di età. Per gli scopi della determinazione dei valori di riferimento, i soggetti normali sono stati definiti come:

- fondamentalmente sani, nessun disordine delle ossa, endocrino o cronico.
- con cicli mestruali regolari (nelle donne).
- nessuna gravidanza o allattamento al seno (donne).
- nessuna assunzione di farmaci attualmente accertata che influenzano il metabolismo osseo (ad esempio corticosteroidi, GnRH-analoghi, anticonvulsivi, eparina, cura della tiroide).

È possibile che i valori siano influenzati da alcuni fattori come bassa produzione di estrogeni, minore assunzione di calcio, bassa attività fisica o malattie accertate che influenzano il metabolismo dell'osso, quali l'osteoporosi, il morbo di Paget, l'iperparatiroidismo, l'ipertiroidismo e la metastasi dell'osso. La mancanza di estrogeni in donne in postmenopausa può causare un elevato riassorbimento dell'osso. Si suggerisce di usare il valore di riferimento della premenopausa per interpretare i risultati in donne in postmenopausa. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca il proprio valore di riferimento normale. I valori vengono espressi come intervalli di riferimento non parametrici (90% CI).

Sesso	Gamma (nmol/mmol)	Media (nmol/mmol)	DS (nmol/mmol)
Donne	16,0-37,0	25,5	7,5
Uomini	12,8-25,6	18,5	4,4

La variabilità attesa all'interno di uno stesso soggetto è stata determinata dai campioni di urina di 49 soggetti sani (26 donne in premenopausa e 23 maschi) prelevati per cinque giorni non consecutivi nell'arco di due settimane. La variazione longitudinale dell'individuo all'interno dello stesso soggetto era di 15%. La variabilità fra i soggetti viene riflessa negli intervalli di riferimento non parametrici sopraelencati.

## CARATTERISTICHE DEL METODO

### Specificità dell'anticorpo

L'anticorpo monoclonale dei legami crociati anti-piridinio ha un'affinità selettiva elevata per PYD e DPD liberi e un legame trascurabile con le peptidi di PYD e DPD.

	Reattività in%
PYD libera	100%
DPD libera	100%
Peptidi di PYD/DPD $\geq$ 1000 MW	< 2,5%

### Sensibilità

Il limite di rilevamento minimo del saggio MicroVue PYD è di 7,5 nmol/L, determinato dal limite superiore di 3 DS in uno studio standard zero.



## Recupero – Recupero dei picchi

Il recupero dei picchi è stato determinato aggiungendo una quantità nota di PYD purificato ai campioni di urina con livelli diversi di PYD endogeno. I risultati tipici vengono forniti di seguito.

Campione	Endogeno (nmol/L)	Aggiunto (nmol/L)	Osservato (nmol/L)	Recupero (%)
1	16,7	68,2	84,1	99
2	71,0	68,2	140,8	102
3	141,0	68,2	215,5	109

## Recupero – Linearità

La linearità è stata determinata diluendo in modo seriale i campioni e confrontando i valori osservati con i risultati attesi. I risultati tipici vengono forniti di seguito.

Campione	Fattore di diluizione	Osservato (nmol/L)	Atteso (nmol/L)	Recupero (%)
1	non diluito	261,6	–	–
	1:2	127,8	130,8	98
	1:4	59,9	65,4	92
	1:8	31,1	32,7	95
2	non diluito	382	–	–
	1:2	183,2	191,0	96
	1:4	90,4	95,5	95
	1:8	57,9	57,1	95
3	non diluito	412,3	–	–
	1:2	199,0	206,2	96
	1:4	98,2	103,1	95
	1:8	47,8	54,5	98

## Precisione

La precisione all'interno di una stessa corsa è stata determinata per 52 ripetizioni di 3 campioni su 1 piastra da ciascuno dei 3 lotti di kit (3 piastre in totale). La precisione fra le corse è stata determinata dall'analisi di 3 campioni in 8 piastre separate da ciascuno dei 3 lotti di kit (24 piastre in totale). I campioni mostrati qui sotto rappresentano una gamma di valori in nmol/L. Per una donna con creatinina di 5,0 mmol/L, i campioni da 1 a 3 rappresentano un riassorbimento normale basso, normale alto ed elevato (13,2 nmol/mmol, 32,0 nmol/mmol e 81,4 nmol/mmol, rispettivamente).

PYD (nmol/L)	All'interno di una stessa corsa <sup>1</sup> C.V.(%)	Fra le corse <sup>2</sup> C.V.(%)
66	9,9	11,2
160	7,0	5,8
407	6,6	3,9

<sup>1</sup>n = 52    <sup>2</sup>n = 8 corse

## STUDI CLINICI

Sono stati eseguiti studi clinici per valutare i livelli di legame crociato del piridinio nell'urina, ottenuti con il saggio MicroVue PYD. Il primo studio è stato condotto in siti per indagine clinica usando 52 campioni di volontari sani e 138 campioni di pazienti con disturbi ossei accertati (osteoporosi, osteoporosi indotta da

farmaci, morbo di Paget, iperparatiroidismo e ipertiroidismo). Al momento del prelievo del campione, tali malattie spesso comportano un elevato riassorbimento del collagene dell'osso.

Nello studio, il saggio MicroVue PYD è stato confrontato con un metodo a cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) per la misurazione di PYD.<sup>12</sup> In uno studio su 84 soggetti sani è stata determinata la soglia di HPLC in 50 nmol/mmol per gli uomini e in 60 nmol/mmol per le donne (limite superiore dell'intervallo di confidenza del 95% per ciascun genere). Centouno dei 138 pazienti affetti da disordine osseo non avevano valori elevati di PYD quando è stata misurata con HPLC. I valori del legame crociato di piridinio (PYD) in soggetti sani andavano da 13,7 a 49,4 nmol/mmol e nei pazienti andavano da 9,8 a 135,9 nmol/mmol.

Usando un PYD elevato determinato da HPLC come metodo di classificazione, è stata usata la tecnica delle caratteristiche operative del ricevente (ROC) per definire una sensibilità e specificità relative e ottimali nella popolazione descritta. La sensibilità e la specificità relative vengono presentate nella tabella 1. Viene presentata una piccola tabella della contingenza che mostra il numero di soggetti in ciascuna classificazione nella Figura 1.

**Tabella 1**  
**MicroVue PYD**

Sens. relativa	84%
Specificità	82%

**Figura 1**

		PYD con HPLC	
		Elevata +	Non elevata -
MicroVue PYD	+	38	26
	-	7	119

Nel secondo studio, i risultati del saggio MicroVue PYD sono stati confrontati in una popolazione mista di 39 campioni di soggetti sani e 99 campioni di pazienti con il morbo di Paget. Sebbene il morbo di Paget rappresenti un modello per l'identificazione del riassorbimento attivo del collagene dell'osso, in questo studio alcuni pazienti sono stati sottoposti a trattamento o è possibile che siano stati in remissione e non abbiano avuto un elevato riassorbimento al momento del prelievo del campione. In questo studio, i soggetti sani andavano da 12,8 a 33,2 nmol/mmol. I pazienti colpiti dal morbo di Paget andavano da 14,4 a 667,6 nmol/mmol.

Con la diagnosi del morbo di Paget come metodo di classificazione, è stata usata la tecnica ROC per definire una sensibilità e specificità relative e ottimali in tale popolazione. La sensibilità e specificità relative sono mostrate nella tabella 2. Una piccola tabella della contingenza viene mostrata nella Figura 2.

**Tabella 2**  
**MicroVue PYD**

Sens. relativa	89%
Specificità	95%

**Figura 2**

		Diagnosi di Paget	
		Si +	No -
MicroVue PYD	+	88	2
	-	11	37

## ASSISTENZA

Per servizi al di fuori degli Stati Uniti, contattare il distributore locale. Le ulteriori informazioni circa Quidel, i nostri prodotti ed i nostri distributori possono essere trovate sul nostro Web site a [quidel.com](http://quidel.com).

## BIBLIOGRAFIA

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**

**PI8010003IT00 (11/19)**

## GLOSSARIO

---

**REF**

Numero di catalogo



Marcio CE di conformità

---

**EC REP**

Rappresentante autorizzato nella  
Comunità Europea

**LOT**

Codice lotto

---



Data di scadenza



Produttore

---



Limitazione di temperatura



Uso previsto

---

**R<sub>x</sub> ONLY**

Esclusivamente per l'uso su prescrizione



Leggere le istruzioni e di  
etichettatura per l'uso

---

**IVD**

Per uso diagnostico *In Vitro*



Contenuto Sufficiente per 96 determinazioni

---

**CONT**

Contenuto / Contiene

**CONTROL**

Controllo

---