

Um imunoenensaio enzimático para a quantificação de ligações cruzadas piridínicas na urina humana

Para uso em diagnóstico *in vitro*.

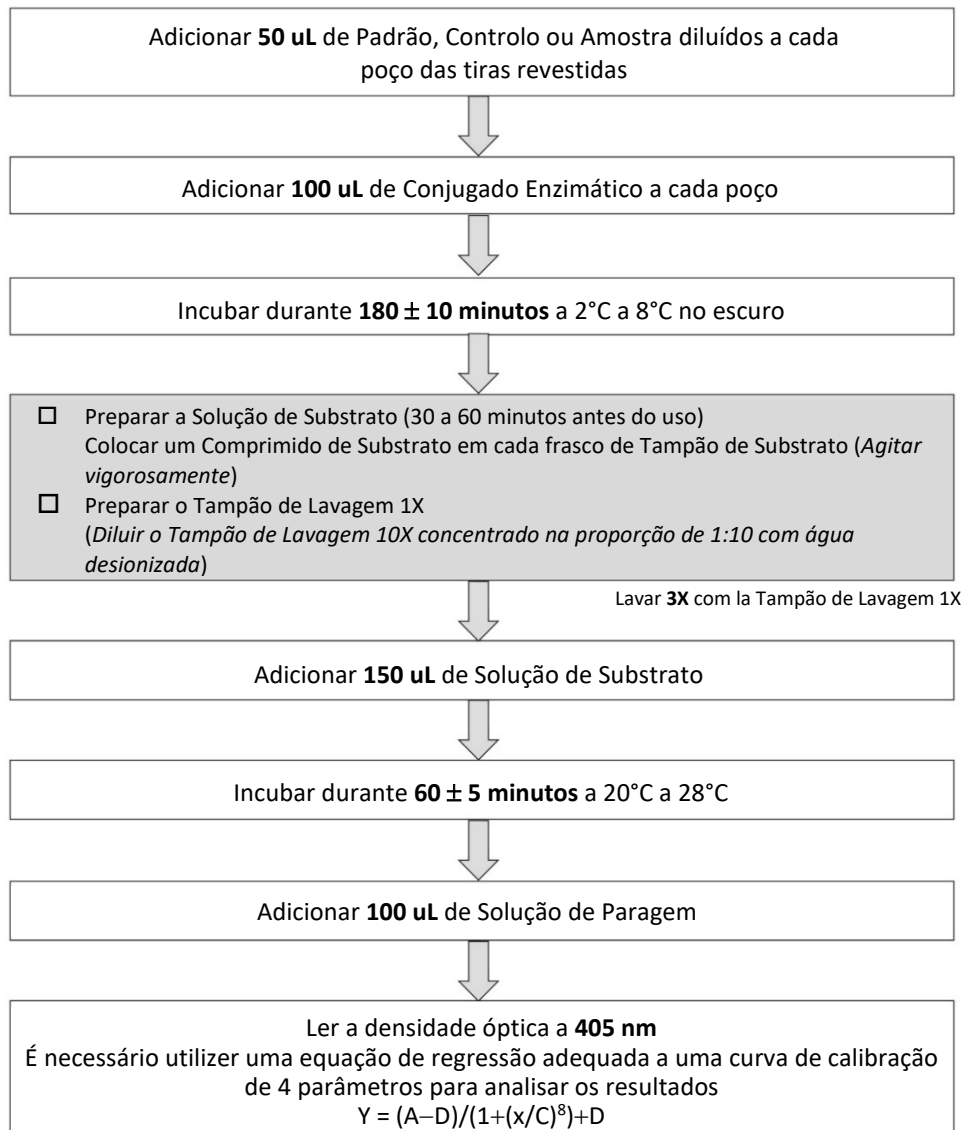
Pode consultar um glossário de símbolos em quidel.com/glossary.

SUMÁRIO

Preparação de Padrões, Controlos e Amostras de Reagentes

- Preparar o Conjugado Enzimático com Tampão de Análise; conservar a 2°C a 8°C (*7 mL de Tampão de Análise fria para cada frasco de Conjugado Enzimático*).
- Diluir as amostras, Padrões e Controlos na proporção de 1:10 com Tampão de Análise (por ex. 50 uL Amostra + 450 uL Tampão de Análise).

Procedimento de Ensaio





FINALIDADE

O MicroVue PYD é um ensaio urinário que proporciona uma medida quantitativa da excreção de ligações cruzadas piridínicas, como um indicador da reabsorção de colagénio tipo I, especialmente colagénio ósseo.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Aproximadamente 90% da matriz orgânica do osso é colagénio tipo I, uma proteína em hélice tripla.¹ O colagénio tipo I do osso tem ligações cruzadas com moléculas específicas que proporcionam rigidez e resistência. As ligações cruzadas do colagénio tipo I maduro no osso são as ligações cruzadas piridínicas, a piridinolina (PYD) e a desoxipiridinolina (DPD).^{1,2} A PYD e a DPD são formadas pela acção enzimática de lisil oxidase sobre o aminoácido lisina.³ São libertadas para a circulação durante o processo de reabsorção óssea.²⁻⁵ As ligações cruzadas piridínicas são excretadas não-metabolizadas na urina e não são afectadas pela dieta,⁶ o que as torna adequadas para avaliação da reabsorção.

O osso está constantemente sujeito a um processo metabólico designado por renovação.^{2,7} Tal inclui um processo de degradação, reabsorção óssea, mediado pela acção dos osteoclastos, e um processo de construção, formação óssea, mediado pela acção dos osteoblastos.^{2,7} A renovação é necessária para a manutenção e saúde geral do osso e está bem interligada; ou seja, a reabsorção e a formação estão em equilíbrio.⁷ Nos estados anormais do metabolismo ósseo este processo deixa de estar interligado e, quando a reabsorção supera a formação, o resultado é uma perda líquida de osso.⁷ A medição de produtos de degradação específicos da matriz óssea proporciona dados analíticos da velocidade do metabolismo ósseo.^{2,4,5}

A osteoporose é uma doença metabólica óssea caracterizada por uma renovação óssea anómala. É uma doença sistémica do esqueleto caracterizada por uma baixa massa óssea e deterioração microarquitectónica do tecido ósseo, com o conseqüente aumento da susceptibilidade às fracturas.⁸ O tipo mais frequente de osteoporose ocorre nas mulheres após a menopausa como resultado da deficiência de estrogénios produzida pela cessação da função dos ovários.⁷ A reposição dos níveis de estrogénios anteriores à menopausa pela terapêutica de substituição impede a perda óssea e a osteoporose.⁷⁻⁹ A utilização de estrogénios e de uma classe de compostos conhecidos como bifosfonatos constitui uma terapêutica que inibe a reabsorção e que pode ser utilizada para impedir a perda óssea ou tratar a osteoporose.⁷⁻¹⁰ A osteoporose pode também resultar do facto de não ser atingida uma massa óssea máxima durante os anos de crescimento, de um desequilíbrio da renovação óssea relacionado com a idade, com um excesso líquido de reabsorção, e de uma série de situações clínicas e terapêuticas que induzem a perda óssea ou desequilíbrios na renovação óssea.⁷ Estas incluem doenças endócrinas como o hipogonadismo, o hipertiroidismo, o hiperparatiroidismo e o hipercortisolismo; doenças gastrointestinais relacionadas com a nutrição e o metabolismo dos minerais; doenças do tecido conjuntivo; mieloma múltiplo; imobilização crónica, alcoolismo ou tabagismo; e terapêutica crónica com heparina ou corticosteróides.⁷ Outras doenças caracterizadas pela renovação óssea anómala incluem a doença de Paget e os cancros com metástases ósseas.³

Para o ensaio MicroVue PYD recorreu-se a uma tecnologia para produzir um anticorpo monoclonal que demonstra especificidade pelas ligações cruzadas piridínicas.¹¹ A especificidade do anticorpo monoclonal utilizado no ensaio MicroVue PYD permite a quantificação simples, conveniente, reprodutível e directa da PYD e da DPD na urina.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O ensaio MicroVue PYD é um imunoensaio enzimático competitivo num formato de tira de placa microtitulação que utiliza um anticorpo monoclonal anti-“ligações cruzadas” piridínicas para medição da PYD e da DPD na urina. A PYD e a DPD na amostra competem para o anticorpo com PYD que se encontra revestido na tira. A reacção é detectada com um substrato pNPP. Os resultados do ensaio MicroVue PYD são corrigidos para uma concentração urinária pela creatinina.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

96 ensaios para ligações cruzadas piridínicas

O kit MicroVue PYD EIA contém o seguinte:

A	Padrões de piridinolina	Peças 4251-4256	0,3 mL cada
B	PYD purificada proveniente de urina humana em 10 mmol/L de ácido fosfórico contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
C			
D			
E			
F			
L	Controlos inferiores	Peças 4257	0,3 mL cada
	PYD purificada proveniente de urina humana em 10 mmol/L de ácido fosfórico contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
H	Controlos superiores	Peças 4258	0,3 mL cada
	PYD purificada proveniente de urina humana em 10 mmol/L de ácido fosfórico contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
1	Tiras revestidas	Peça 4668	12 de cada
	PYD purificada proveniente de osso de bovino absorvida em tiras de poços		
2	Solução de paragem da reacção	Peça 4702	15 mL
	NaOH 0,5N		
3	Tampão de lavagem 10X	Peça 4703	55 mL
	Detergente não-iónico numa solução tamponada contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
4	Tampão de análise	Peça 4704	55 mL
	Detergente não-iónico numa solução tamponada contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
5	Tampão de substrato	Peça 4705	3 x 10 mL
	Uma solução de dietanolamina e cloreto de magnésio contendo azida de sódio (0,05%) como conservante		
6	Comprimidos de substrato	Peça 0012	3 x 20 mg
	p-nitrofenil fosfato		
7	Conjugado enzimático	Peça 4250	3 de cada
	Anticorpo monoclonal murínico liofilizado anti-“ligações cruzadas” piridínicas conjugado com fosfatase alcalina contendo sais tampão e estabilizadores		
	Cobertura para tiras da placa	Peça 0047	3 de cada

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipetas para distribuição de 50 µL a 300 µL
- Itens adequados para medição de líquidos de 7 mL a 300 mL
- Recipiente para diluição do tampão de lavagem
- Tubos para diluição de amostras, padrões e controlos
- Água desionizada ou destilada
- Leitor de microplacas com capacidade de leitura a 405 nm
- Software adequado a uma regressão da curva de calibração de 4 parâmetros
- Valores da creatinina (mmol/L) para as amostras de urina

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Para diagnóstico *in vitro*.

- Tratar as amostras como material que possa constituir perigo biológico. Seguir as precauções universais ao manusear o conteúdo deste kit e quaisquer amostras dos doentes.
- Utilizar os reagentes fornecidos como uma unidade inteira antes da data de validade inscrita na etiqueta da embalagem.
- Conservar os reagentes do ensaio conforme indicado.
- Não utilizar as tiras revestidas se a bolsa estiver perfurada.
- Analisar cada amostra em duplicado.
- NaOH 0,5N é considerado corrosivo e pode provocar irritação na pele. Não ingerir. Evitar o contacto com a pele, os olhos ou o vestuário. Se houver contacto, lavar com água. Em caso de ingestão, consultar um médico.
- A azida de sódio é utilizada como conservante. O contacto com tampões ou a respectiva ingestão acidental contendo azida de sódio pode provocar irritação na pele, nos olhos ou na boca. Utilizar os tampões apenas para os fins previstos e evitar o contacto com ácidos. A azida de sódio pode reagir com as canalizações de chumbo e de cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Aquando da sua eliminação, deixe correr muita água de modo a evitar uma acumulação deste produto.
- O tampão de substrato contém dietanolamina e poderá provocar irritação nos olhos e/ou pele em caso de contacto prolongado. As zonas que tenham estado em contacto com este produto deverão ser imediatamente lavadas com água e sabão.
- Os padrões e controlos encontram-se em 10 mmol/L de ácido fosfórico. Evitar o contacto com a pele, os olhos ou o vestuário. Não ingerir. Se houver contacto, lavar com água. Em caso de ingestão, consultar um médico.
- Para assegurar o fornecimento atempado dos reagentes, recomenda-se a utilização de pipetas multicanal ou de repetição.
- Para uma medição precisa de amostras, adicionar as amostras e os padrões com precisão. Utilizar a pipeta com cuidado recorrendo apenas a equipamento calibrado.
- Não usar um poço de microensaio para mais do que um teste.
- A utilização de tempos ou temperaturas de incubação diferentes dos especificados na secção *Procedimento de Ensaio* pode originar resultados erróneos.
- Os padrões de piridinolina, os controlos, as tiras revestidas e as amostras de urina são sensíveis à luz. Evitar a exposição prolongada à luz, especialmente à luz solar directa ou indirecta. Conservar os reagentes no escuro quando não estiverem a ser utilizados. As amostras e os reagentes não são afectados de forma significativa pela luz artificial normal de laboratório, quando manuseados conforme indicado no *Procedimento de Ensaio*.
- Não permitir que os poços do microensaio sequem depois de iniciar o ensaio.
- Ao remover líquido dos poços do microensaio, não raspar nem tocar no fundo dos poços.
- Deve ser utilizado um frasco de lavagem ou dispositivo de lavagem automático para lavar a placa (*PROCEDIMENTO DE ENSAIO*, passo 8). Para melhores resultados, não utilizar uma pipeta multicanal para lavar a placa do microensaio.
- Esta análise foi validada para lavagem manual.
- Os testes devem ser realizados numa área com ventilação adequada.
- Elimine os recipientes e conteúdo não utilizado de acordo com federais, estatais e requisitos regulamentares locais.
- Usar vestuário adequado, luvas e protecção de rosto e olhos sempre que manusear o conteúdo deste kit.
- Lave bem as mãos após o manuseamento.
- Para obter informações adicionais sobre os símbolos de perigo, segurança, o manuseamento e a eliminação dos componentes contidos neste kit, consulte a Ficha de Dados de Segurança (SDS) disponível em quidel.com.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de lavagem

Ver Nota do Procedimento na secção *PROCEDIMENTO DE ENSAIO*.

Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro na secção *PROCEDIMENTO DE ENSAIO*) diluindo o tampão de lavagem 10X concentrado na proporção de 1:10 com água desionizada. Conservar a 20°C a 28°C. Utilizar o tampão de lavagem 1X nas 21 dias seguintes à preparação.

Instruções especiais de lavagem: Preparar o tampão de lavagem 1X conforme descrito acima e conservar a 2°C a 8°C até ser utilizado.

Conjugado enzimático

Preparar o conjugado enzimático 2 horas antes da sua utilização. Reconstituir cada frasco necessário de conjugado enzimático (ver quadro) com 7 mL de tampão de análise frio. Conservar o conjugado enzimático reconstituído a 2°C a 8°C até ser utilizado.

Solução de substrato de trabalho

Colocar o tampão de substrato à temperatura de 20°C a 28°C antes de iniciar o ensaio. (Duas horas ou de um dia para o outro é o tempo recomendado.) Preparar a solução de substrato de trabalho 1 hora antes da sua utilização. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário à 20°C a 28°C (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente.

ARMAZENAMENTO

Conservar o kit a 2°C a 8°C.

Conservar os reagentes não utilizados a 2°C a 8°C.

Conservar 1X Tampão de lavagem (10X diluído) a 20°C a 28°C.

COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

O ensaio MicroVue PYD pode ser realizado utilizando colheitas da primeira urina da manhã ou da segunda urina da manhã, colhidas sem conservantes. As colheitas longitudinais (por exemplo, quando se estão a avaliar alterações na reabsorção) devem ser efectuadas aproximadamente à mesma hora todos os dias. Manter a amostra de urina refrigerada (2°C a 8°C) se o período de conservação for inferior a 7 dias, ou congelar a amostra a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ para um período de conservação mais longo. Não sujeitar a amostra a mais de 3 ciclos de congelação e descongelação. Evitar a exposição prolongada à luz, especialmente à luz solar. Durante o processamento de rotina, as amostras não são afectadas pela luz artificial normal de laboratório.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Ler o folheto informativo completo antes de iniciar o ensaio.

Ver *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES* antes de prosseguir.

NOTA DO PROCEDIMENTO: O ensaio MicroVue PYD é sensível às condições de lavagem. O **passo de lavagem completo** deverá estar concluído em **2 minutos**. Se o **passo de lavagem NÃO PUDER** estar concluído em 2 minutos, siga as **Instruções Especiais de Lavagem** que se encontram nas secções **PREPARAÇÃO DOS REAGENTES** e **Passo de lavagem**.

Determine a quantidade de cada reagente necessário para o número de tiras que vão ser utilizadas.

N.º de tiras	4	6	8	12
N.º de amostras (analisadas em duplicado)	8	16	24	40
Conjugado enzimático (frasco)	1	1	2*	2*
Substrato (frasco)	1	1	2*	2*
Tampão de lavagem 1X (mL)	100	150	200	300

* Quando se vai utilizar mais do que um frasco, combinar o conteúdo e misturar antes de utilizar.

Incubação da amostra/conjugado enzimático

1. Diluir as amostras, padrões e controlos na proporção de 1:10 com tampão de análise (por exemplo, 50 µL de amostra + 450 µL de tampão de análise).
2. Remover a armação das tiras de poços e retirar o número necessário de tiras revestidas da bolsa (ver quadro). Verificar se a bolsa que contém as tiras não usadas fica perfeitamente selada.
3. Colocar o número pretendido de tiras revestidas na armação das tiras de poços. Rotular as tiras para evitar que se misturem em caso de remoção acidental da armação das tiras de poços.
4. Adicionar 50 µL de padrão, controlo ou amostra diluídos a cada poço das tiras revestidas. Este passo deverá estar concluído em 30 minutos.
5. Preparar o conjugado enzimático 2 horas antes da sua utilização. Reconstituir cada frasco necessário de conjugado enzimático (ver quadro) com 7 mL de tampão de análise frio (2°C a 8°C). Conservar o conjugado enzimático reconstituído a 2°C a 8°C até ser utilizado.
6. Adicionar 100 µL de conjugado enzimático reconstituído a cada poço. Cobrir as tiras com a cobertura para tiras fornecida. Incubar durante 3 horas (± 10 minutos) a 2°C a 8°C. Esta incubação deverá ser efectuada no escuro.
7. Preparar a solução de substrato de trabalho 1 hora antes da sua utilização. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário à 20°C a 28°C (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente.

Passo de lavagem

8. Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro) diluindo o tampão de lavagem 10X na proporção de 1:10 com água desionizada. Inverter/esvaziar manualmente as tiras (do passo 6). Adicionar pelo menos 250 µL de tampão de lavagem 1X a cada poço e inverter/esvaziar manualmente as tiras. Repetir mais duas vezes para um total de três lavagens. Secar as tiras comprimindo-as vigorosamente sobre toalhas de papel após a última lavagem. Enquanto as tiras estão invertidas, limpar cuidadosamente o fundo das tiras com uma toalha de papel que não largue fibras para assegurar que o fundo das tiras se encontra limpo.

Instruções especiais de lavagem: Executar o passo de lavagem conforme descrito acima, utilizando tampão de lavagem 1X frio (2°C a 8°C). Após a última lavagem, deixar as tiras escorrer durante 5 a 10 minutos sobre toalhas de papel antes de adicionar o substrato.

Incubação do substrato

9. Adicionar 150 µL de solução de substrato de trabalho a cada poço.
10. Incubar durante 60 minutos (± 5 minutos) a 20°C a 28°C.
NOTA: Se não for possível manter a temperatura ambiente entre 20°C e 28°C e se uma absorvência de > 2,0 não for compatível com o seu leitor de placas, monitorize o desenvolvimento do substrato nos poços de Padrão A ; pare a reacção quando a densidade óptica atingir 1,2 a 1,5; a seguir, leia as tiras.

Parar/Ler

11. Adicionar 100 µL de solução de paragem a cada poço. Adicionar a solução de paragem seguindo o mesmo padrão e os mesmos intervalos de tempo utilizados na adição da solução de substrato.
12. Ler a densidade óptica a 405 nm. Assegurar que não existem bolhas de grandes dimensões nos poços e que o fundo das tiras está limpo. As tiras devem ser lidas **15 minutos** depois da adição da solução de paragem.
13. Utilizar software de quantificação com uma equação de regressão adequada a uma curva de calibração de 4 parâmetros para analisar os resultados do ensaio MicroVue PYD.

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

14. Determinar a concentração de amostras e controlos a partir da curva padrão.

- a. Diluir as amostras que resultem em valores superiores ao controlo padrão mais elevado em tampão de análise e analisar novamente. Incluir o factor de diluição no cálculo final.
- b. Os valores de controlo devem estar dentro dos limites especificados no Certificado de Análise fornecido com o kit.

CONTROLO DE QUALIDADE

O Certificado de Análise incluído neste kit é específico do lote e deve ser utilizado para verificar se os resultados obtidos pelo seu laboratório são semelhantes aos obtidos na Quidel. Os valores da densidade óptica são fornecidos e devem ser utilizados apenas como linha de orientação. Os resultados obtidos pelo seu laboratório podem ser diferentes.

São fornecidos intervalos para o controlo de qualidade. Os valores de controlo destinam-se a verificar a validade da curva e os resultados das amostras. Cada laboratório deve definir os seus próprios parâmetros para os limites aceitáveis dos ensaios. Se os valores de controlo NÃO estiverem dentro dos limites de aceitação do seu laboratório, os resultados dos ensaios devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

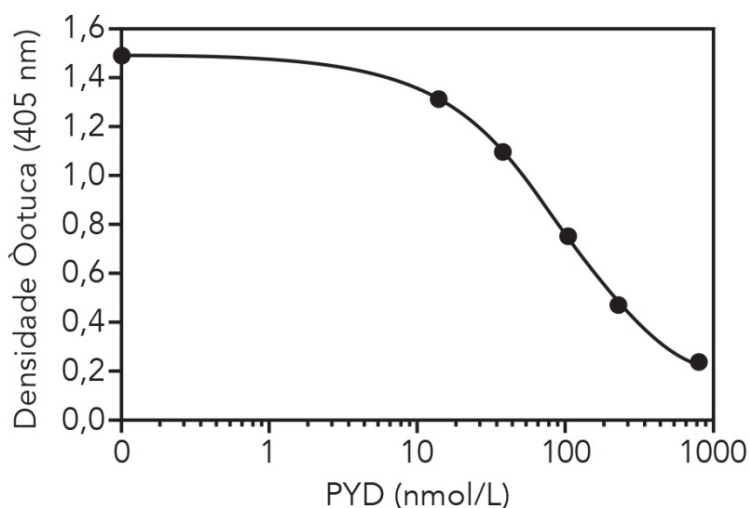
Se a densidade óptica do MicroVue PYD Standard A for inferior a 0,8, os resultados devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos com o ensaio MicroVue PYD devem ser corrigidos para as variações na concentração urinária dividindo o valor das ligações cruzadas piridínicas (nmol/L) pelo valor da creatinina (mmol/L) de cada amostra ($\text{creatinina mg/dL} \times 0,088 = \text{mmol/L}$). Os resultados finais do ensaio MicroVue PYD serão expressos como nmol PYD e DPD/mmol creatinina.

Curva padrão representativa

Níveis padrão da PYD: 0, 15, 40, 100, 250, 750 nmol/L



LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Embora o ensaio MicroVue PYD seja utilizado como um indicador da reabsorção do colagénio tipo I, especialmente colagénio ósseo, a utilização deste teste não foi estabelecida para previsão do desenvolvimento de osteoporose ou do risco de fracturas futuras. A utilização deste teste não foi estabelecida na menopausa, na doença óssea de Paget, no hiperparatiroidismo primário ou no hipertiroidismo. Os resultados poderão ser confundidos nos doentes que sofrem de outros problemas clínicos que afectam a reabsorção do colagénio ósseo, por exemplo, metástases ósseas além das doenças e

dos problemas indicados acima. Os resultados do ensaio MicroVue PYD devem ser interpretados em conjunto com as evidências clínicas e outros resultados do diagnóstico.

VALORES DA AMOSTRA

Os intervalos de referência do ensaio MicroVue PYD foram estabelecidos para homens saudáveis (n = 118) e mulheres saudáveis pré-menopausa (n = 301) com mais de 25 anos de idade. Para efeitos do estabelecimento dos intervalos de referência, os participantes normais foram definidos como:

- Basicamente saudáveis, sem distúrbios ósseos, endócrinos ou crónicos
- Ciclos menstruais regulares (mulheres)
- Nem grávidas nem em fase de aleitamento (mulheres)
- Sem estarem actualmente a tomar qualquer medicação conhecida por influenciar o metabolismo ósseo (por exemplo, corticosteróides, análogos de GnRH, anticonvulsivantes, heparina, medicação para a tiróide)

Os valores podem ser influenciados por factores como a baixa produção de estrogénio, baixa ingestão de cálcio, actividade física reduzida ou doenças conhecidas por afectarem o metabolismo ósseo como, por exemplo, a osteoporose, a doença de Paget, o hiperparatiroidismo, o hipertiroidismo e as metástases ósseas. A deficiência de estrogénio nas mulheres após a menopausa pode ter como resultado uma reabsorção óssea aumentada. Sugere-se que os intervalos de referência pré-menopausa sejam utilizados para interpretar os resultados nas mulheres após a menopausa. Cada laboratório deve definir os seus próprios intervalos de referência normais. Os limites são expressos como intervalos de referência não paramétricos (IC de 90%).

Sexo	Intervalo (nmol/mmol)	Média (nmol/mmol)	DP (nmol/mmol)
Mulheres	16,0 a 37,0	25,5	7,5
Homens	12,8 a 25,6	18,5	4,4

A variabilidade prevista dentro dos participantes foi determinada a partir de amostras de urina de 49 participantes saudáveis (26 mulheres pré-menopausa e 23 homens) colhidas durante cinco dias não consecutivos ao longo de duas semanas. A média da variação longitudinal individual dentro dos participantes foi de 15%. A variabilidade entre participantes está reflectida nos intervalos de referência não paramétricos indicados acima.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Especificidade do anticorpo

O anticorpo monoclonal anti-“ligações cruzadas” piridínicas tem uma elevada afinidade selectiva pela PYD e DPD livres e uma ligação negligenciável aos péptidos de PYD e DPD.

	% Reactividade
PYD livre	100%
DPD livre	100%
Péptidos de PYD/DPD \geq 1000 MW	< 2,5%

Sensibilidade

O limite de detecção mínimo do ensaio MicroVue PYD é 7,5 nmol/L, determinado pelo limite superior de 3 DP num estudo de padrão zero.

Recuperação – Recuperação por fortificação

A recuperação por fortificação foi determinada adicionando uma quantidade conhecida de PYD purificada a amostras de urina com diferentes níveis de PYD endógena. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

Amostra	Endógena (nmol/L)	Fortificada (nmol/L)	Observada (nmol/L)	Recuperação (%)
1	16,7	68,2	84,1	99
2	71,0	68,2	140,8	102
3	141,0	68,2	215,5	109

Recuperação – Linearidade

A linearidade foi determinada diluindo amostras em série e comparando os valores observados com os valores esperados. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

Amostra	Factor de diluição	Observado (nmol/L)	Esperado (nmol/L)	Recuperação (%)
1	razão	261,6	–	–
	1:2	127,8	130,8	98
	1:4	59,9	65,4	92
	1:8	31,1	32,7	95
2	razão	382	–	–
	1:2	183,2	191,0	96
	1:4	90,4	95,5	95
	1:8	57,9	57,1	95
3	razão	412,3	–	–
	1:2	199,0	206,2	96
	1:4	98,2	103,1	95
	1:8	47,8	54,5	98

Precisão

A precisão intra ensaios foi determinada para 52 réplicas de 3 amostras em 1 placa de cada 3 lotes de kits (3 placas no total). A precisão entre ensaios foi determinada para ensaio de 3 amostras em 8 placas separadas de cada 3 lotes de kits (24 placas no total). As amostras indicadas a seguir representam uma gama de valores de nmol/L. Para uma mulher com uma creatinina de 5,0 mmol/L, as amostras 1 a 3 representam uma reabsorção normal baixa, normal elevada e aumentada (13,2 nmol/mmol, 32,0 nmol/mmol e 81,4 nmol/mmol, respectivamente).

PYD (nmol/L)	Intra ensaios ¹ C.V.(%)	Entre ensaios ² C.V.(%)
66	9,9	11,2
160	7,0	5,8
407	6,6	3,9

¹n = 52 ²n = 8 ensaios

ESTUDOS CLÍNICOS

Foram realizados estudos clínicos para avaliar os níveis de ligações cruzadas piridínicas na urina utilizando o ensaio MicroVue PYD. O primeiro estudo foi realizado em centros de investigação clínica utilizando 52 amostras de voluntários saudáveis e 138 amostras de doentes com distúrbios ósseos conhecidos (osteoporose, osteoporose induzida por fármacos, doença de Paget, hiperparatiroidismo e

hipertiroidismo). Estas doenças envolvem muitas vezes a reabsorção aumentada do colagénio ósseo na altura da colheita das amostras.

No estudo, o ensaio MicroVue PYD foi comparado com um método de investigação de cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) para medição da PYD.¹² O limite de HPLC foi determinado, num estudo de 84 participantes adultos saudáveis, como sendo 50 nmol/mmol para os homens e 60 nmol/mmol para as mulheres (limite superior do intervalo de confiança de 95% para cada sexo). Cento e um dos 138 doentes diagnosticados com um distúrbio ósseo não manifestaram valores aumentados de PYD conforme medido por HPLC. Os valores PYD das ligações cruzadas piridínicas em participantes saudáveis variaram de 13,7 a 49,4 nmol/mmol e nos doentes variaram de 9,8 a 135,9 nmol/mmol.

Utilizando uma PYD aumentada determinada por HPLC como método de classificação, recorreu-se à técnica ROC (característica operacional do receptor) para definir uma sensibilidade relativa óptima e uma especificidade na população descrita. A sensibilidade relativa e a especificidade são apresentadas no Quadro 1. Na Figura 1 apresenta-se um quadro de contingência de dois por dois indicando o número de participantes em cada classificação.

Quadro 1
MicroVue PYD

Sensibilidade relativa	84%
Especificidade	82%

Figura 1

		PYD por HPLC	
		Aumentada +	Não aumentada -
MicroVue PYD	+	38	26
	-	7	119

Num segundo estudo, os resultados do ensaio MicroVue PYD foram comparados numa população mista de 39 amostras de participantes saudáveis e 99 amostras de doentes com doença de Paget. Embora a doença de Paget represente um modelo de identificação da reabsorção activa de colagénio ósseo, alguns dos doentes que participaram neste estudo estavam em tratamento ou podem ter estado em remissão, e podem não ter tido uma reabsorção aumentada na altura da colheita das amostras. Neste estudo, os participantes saudáveis variaram de 12,8 a 33,2 nmol/mmol. Os doentes com doença de Paget variaram de 14,4 a 667,6 nmol/mmol.

Utilizando o diagnóstico da doença de Paget como método de classificação, recorreu-se à técnica ROC (característica operacional do receptor) para definir uma sensibilidade relativa óptima e uma especificidade nesta população. A sensibilidade relativa e a especificidade são apresentadas no Quadro 2. Na Figura 2 apresenta-se um quadro de contingência de dois por dois.

Quadro 2
MicroVue PYD

Sensibilidade relativa	89%
Especificidade	95%

Figura 2

		Diagnóstico de Paget	
		Sí	No
MicroVue PYD	+	88	2
	-	11	37

ASSISTÊNCIA

Para serviços fora dos EUA, contacte o seu distribuidor local. As informações adicionais sobre Quidel, nossos produtos, e nossos distribuidores pode ser encontrada em nosso web site em quidel.com.

REFERÊNCIAS

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

PI8010003PT00 (11/19)

GLOSSÁRIO

REF

Número de catálogo



Marca CE de conformidade

EC REP

Representante autorizado na Comunidade Europeia

LOT

Número do lote



Utilizar até



Fabricante



Limitação de temperatura



Utilização prevista

Rx ONLY

Apenas receita médica



Consulte as instruções e-rotulagem de utilização

IVD

Para diagnóstico *in vitro*



Contém o suficiente para 96 determinações

CONT

Conteúdo / Contem

CONTROL

Controlo
