

AIDIAN

UniQ[®] PINP RIA

Intact N-terminal propeptide of type I
procollagen, radioimmunoassay

Cat. No. 67034



132059-21

**Explanation of symbols • Erläuterung der Symbole • Explication des symboles
Verklaring van symbolen • Explicación de los símbolos**

	English	German	Français	Nederlands	Español	
IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device	<i>In-vitro</i> Diagnostikum	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	Alleen voor <i>in vitro</i> diagnostisch gebruik	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>	
REF	Catalogue number	Artikelnummer	Référence	Catalogus nummer	Número de catálogo	
LOT	Batch code	Chargen-bezeichnung	Lot	Batch code	Número de lote	
	Use by	Verwendbar bis	Utiliser jusqu'au	Gebruik door	Fecha de caducidad	
	Temperature limit	Temperaturbegrenzung	Limites de température	Temperatuurlimiet	Limitación de temperatura	
	Consult instructions for use	Nachschlagen in der Bedienungsanleitung	Consulter la notice d'utilisation	Raadpleeg gebruiksinstructie	Consulte las instrucciones de uso	
	Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Producent	Fabricante	
	Sufficient for	Ausreichend für	Suffisant pour	Voldoende voor	Válido para	
Ag ^{125I}	Tracer	Tracer	Traceur	Tracer	Trazador	
Ab	Antiserum	Antiserum	Antiserum	Antiserum	Antisuero	
REAG SEPAR	Separation Reagent	Trennreagenz	Réactif de séparation	Scheidingsreagens	Reactivo de separación	
CONTROL #	Control	Kontrolle	Contrôle	Controle	Control	
CAL xx µg/l	Calibrator concentration	Kalibrator-konzentration	Concentration de l'étalon	Kalibrator concentratie	Concentración del calibrador	
ORIG RAB	Origin: rabbit	Ursprung: Kaninchen	Origine: lapin	Oorsprong: konijn	Origen: conejo	
ORIG HUM	Origin: human	Ursprung: menschlich	Origine: humaine	Oorsprong: humane	Origen: humano	
CONT NaN₃	Contains sodium azide	Enthält Natriumazid	Contient de l'azide de sodium	Bevat natrium azide	Contiene azida sódica	
CH REP	Authorised representative in Switzerland	Autorisierter Vertreter in der Schweiz	Représentant autorisé en Suisse	Gemachtigde vertegenwoordiger in Zwitserland	Representante autorizado en Suiza	

**Spiegazione dei simboli • Vysvětlení použitých symbolů • Objaśnienie symboli na etykietach
Förklaring av symboler • Forklaring av symboler • Forklaring af symboler som anvendes på etiketterne**

Italiano	Česky	Polski	Svenska	Norsk	Dansk
Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>	Wyrób medyczny do diagnozy <i>in vitro</i>	Medicinteknisk produkt avsedd för <i>in vitro</i> -diagnostik	Medisinsk utstyr for <i>in vitro</i> - diagnostikk	Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> diagnostik
Numero di catalogo	Katalogové číslo	Numer w katalogu	Artikelnummer	Varenummer	Varenummer
Lotto di produzione	Číslo šarže	Numer serii	Batch nr	Batch nr.	Lot nr.
Utilizzare entro	Spotřebujte do	Użyć przed	Används före	Brukes innen	Anvendes inden
Limiti di temperatura	Teplotní omezení	Zakres temperatur	Temperatur- begränsning	Temperatur- begrensning	Temperatur- begrænsning
Consultare le istruzioni d'uso	Viz návod k použití	Przed użyciem zapoznać się z instrukcją	Se användar- manual	Se bruks- anvisning	Se brugs- anvisningen
Produttore	Výrobce	Producent	Tillverkare	Produsent	Producent
Sufficiente per	Vhodné pro	Wystarczający na	Räcker till	Tilstrekkelig for	Tilstrækkeligt til
Tracciante	Radioindikátor	Znacznik	Tracer	Tracer	Tracer
Antisiero	Antisérum	Przeciwciało	Antiserum	Antiserum	Antiserum
Reattivo di separazione	Separální reagencie	Odzynnik separujący	Separations- reagens	Separasjons- reagens	Separations- reagens
Controllo	Kontrola	Kontrol	Kontroll	Kontrol	Kontrol
Concentrazione del calibratore	Koncentrace kalibrátoru	Stężenie wzorca	Kalibrator koncentration	Kalibrator konsentrasjon	Kalibrator koncentration
Origin: coniglio	Původ: králíčí	Substancja pochodzenia króliczego	Ursprung: kanin	Opprinnelse: kanin	Origin: kanin
Origin: humane	Původ: lidský	Substancja pochodzenia ludzkiego	Ursprung: human	Opprinnelse: human	Origin: human
Contiene sodio azide	Obsahuje azid sodný	Zawiera azydek sodu	Innehåller natriumazid	Inneholder natriumazid	Indeholder natriumazid
Rappresentante autorizzato in Svizzera	Autorizovaný zástupce ve Švýcarsku	Autoryzowany przedstawiciel w Szwajcarii	Auktoriserad representant i Schweiz	Autorisert representant i Sveits	Autoriseret repræsentant i Schweiz

UniQ® PINP RIA

Intact N-terminal propeptide of type I procollagen, radioimmunoassay
Cat. No. 67034

Instructions for use	6
Gebrauchsinformation	20
Notice d'utilisation.....	36
Gebruikers instructie.....	50
Instrucciones de uso.....	64
Istruzioni per l'uso.....	78
Návod k použití.....	92
Instrukcja.....	106
Bruksanvisning, svenska.....	120
Bruksanvisting, norsk.....	134
Brugsvejledning, dansk	144
Literature • Literatur • Bibliographie Bibliografia • Literatura • Litteratur	158

UniQ® PINP RIA

Intact N-terminal propeptide of type I procollagen, radioimmunoassay

1. INTENDED USE

UniQ PINP RIA is a quantitative radioimmunoassay designed for the measurement of the concentration of intact aminoterminal propeptide of type I procollagen, an indicator of osteoblastic activity, in human serum. The test is designed to be used as an aid in the management of postmenopausal osteoporosis.

For *in vitro* diagnostic use.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Type I collagen, which is synthesised by fibroblasts and osteoblasts, is the most abundant collagen type in the body and the only collagen type found in mineralised bone, where it accounts for more than 90 % of the organic matrix. Since bone is the major collagenous organ and metabolically highly active throughout life, the majority of the synthesised type I collagen stems from bone osteoblasts.

Bone collagen is derived from a larger protein – type I procollagen –, which consists of three amino acid chains that are intertwined to form a rod-like triple helix. Type I procollagen has propeptide extensions at both ends of the molecule, which are removed by specific proteinases before the collagen molecules thus formed are assembled into collagen fibres. Both propeptides can be found in the circulation, where their concentration reflects the synthesis rate of type I collagen. The UniQ PINP RIA assay measures the serum concentration of the aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP).¹ As the concentration of this extension propeptide is directly proportional to the amount of new collagen laid down in bone, it can be used to assess bone formation.

During bone formation, the bone matrix is produced before mineralisation occurs; hence PINP is an early marker of bone formation. Bone alkaline phosphatase, a cell membrane enzyme present in preosteoblasts and osteoblasts, is another early marker of osteoblast activity.² Osteocalcin is a later marker of osteoblast differentiation that appears in the bone mineralisation phase.³

Bone tissue is remarkably metabolically active and throughout life undergoes constant remodelling. Bone remodelling is achieved by two counteracting processes: bone formation and bone resorption, which under normal conditions are tightly coupled to each other. Metabolic bone diseases are characterised by imbalances in bone turnover and often lead to an uncoupling between bone formation and resorption.⁴ An indicator of type I collagen turnover, such as PINP, is very useful for investigating skeletal remodelling under normal and abnormal conditions.

The UniQ PINP assay provides a sensitive tool for assessing increased bone turnover in postmenopausal women⁵⁻⁹ and may be particularly useful for monitoring the effect of antiresorptive and anabolic therapy on bone metabolism.¹⁰⁻²¹ The determination of PINP concentrations has also been used to detect increases in type I collagen turnover in Paget's disease of bone.²²⁻²⁴

3. PRINCIPLES OF THE TEST

The UniQ PINP RIA kit is based on the competitive radioimmunoassay technique. A known amount of labelled PINP and an unknown amount of unlabelled PINP in the sample compete for a limited number of high affinity binding sites on the polyclonal rabbit anti-PINP antibody. A second antibody, directed against rabbit IgG and coated to kaolin particles, is used to separate the antibody-bound PINP from free PINP. The radioactivity of the bound tracer antigen is measured in a gamma counter. The amount of labelled PINP in the sample tube is inversely proportional to the

amount of PINP in the sample. The concentrations in unknown samples are obtained from a calibration curve, which is based on the concurrent testing of the UniQ PINP RIA calibrators that contain 0 to 250 µg/l PINP.

4. REAGENTS

UniQ® PINP RIA, Cat. No. 67034

Component name and origin	Symbol	 100	Stability at 2...8°C	
			Unopened	Opened
Tracer	Ag ¹²⁵ I	22 ml Radioactivity < 200 kBq	Until the expiration date marked on the label	6 weeks
Antiserum ORIG RAB	Ab	22 ml	Until the expiration date marked on the label	6 weeks
Calibrator	CAL xxµg/l	7 x 0.5 ml	Until the expiration date marked on the label	6 weeks
Control ORIG HUM	CONTROL #	2 x 1.0 ml	Until the expiration date marked on the label	6 weeks after reconstitution.
Procollagen Separation Reagent	REAG SEPAR	60 ml	Until the expiration date marked on the label	6 weeks
Instructions for use				

Reagents contain sodium azide as a preservative. See section 5 "Warnings and precautions".

Reagent preparation

The controls are lyophilized. All other reagents are ready to use.

Allow the **control** vials to reach room temperature (18...25°C) before opening. Reconstitute the controls by adding 1.0 ml distilled or deionised water to each vial. Cap and mix well by gentle swirling or inverting to avoid foaming.

Allow to stand for 30 minutes before use.

Reagent deterioration

Alterations in the physical appearance of the reagents or in the slope of the calibrator curve, or values of control sera outside the manufacturer's acceptable range may be an indication of reagent instability. Do not use reagents if you suspect reagent deterioration.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Health and safety information

- For *in vitro* diagnostic use only.
- **Rx only:**
 - Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner.
 - For prescription use only.
 - For professional use only.
- Do not pipette by mouth.
- All patient samples and controls should be handled as potentially infectious material.
- The controls contain material of human origin, which has been tested and found negative for human immunodeficiency virus antibodies (HIV 1 and 2), hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B surface antigen (HBsAg). As a precaution, handle the controls as if capable of transmitting infectious agents.
- Lyophilised reagents contain < 1% sodium azide (Aquatic Chronic 3). Harmful to aquatic life with long lasting effects (H412). Contact with acids liberates very toxic gas (EUH032). Avoid release to the environment (P273). Dispose of contents according to national and local law (P501). Azides may react with metal plumping, forming explosive compounds. Azide build-up can be avoided by flushing with a large volume of water when disposing of the reagents.
- Reconstituted and liquid reagents contain < 0.1% sodium azide, which is not considered a harmful concentration.
- The kit contains ¹²⁵I (half-life $t_{1/2}$ of 60 days) emitting 35.5 keV gamma rays and 27–32 keV X-rays. Radioactive material contained in this kit may be received, acquired, possessed and used only by physicians, clinical laboratories, research institutions or hospitals and used only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom to human beings or animals. All radioactive materials should be stored and handled only in specifically designated areas. The purchase, storage, use or exchange of radioactive products is subject to the laws in force in the user's country.
- Avoid contact with skin and eyes. After contact with skin, wash immediately with plenty of water and decontaminate, following your institution's guidelines for accidental spills.
- Spills of radioactive materials should be cleaned immediately with a detergent and the contaminated cleaning materials transferred to the radioactive waste container or handled according to the recommendations of the radiation safety office.
- Refer to the radiation regulations and procedures applicable to your institution for handling, storage and disposal of radioactive materials.

Analytical precautions

- Do not use the product after the expiry date marked on the outer package.
- Do not exceed the stability periods for opened reagents.
- Do not mix components from different lot numbers or different tests.

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

No special preparation of the patient is required prior to sample taking.

Serum should be used and a normal venous blood sample should be collected using an acceptable medical technique, following the normal precautions for venipuncture. The assay is not to be used with plasma samples.

Highly lipemic, hemolyzed or microbiologically contaminated patient samples should be avoided.

Sample handling and storage

After the specimen collection, allow the blood to clot and separate serum by centrifugation. Serum samples may be stored for up to 5 days at 2...8°C. For longer periods, store the samples at –20°C or colder. Repeated freezing and

thawing should be avoided.

Samples with high PINP concentrations may be diluted using 0.9 % saline.

7. PROCEDURE

See the section 4, "Reagents", for a list of reagents.

Materials required but not provided

- Pipettes (for accurately delivering 50 µl, 200 µl, 500 µl and 1000 µl)
- Test tubes (polystyrene, e.g. 12 x 75 mm)
- Absorbent paper
- Paraffin film
- Vortex mixer
- Water bath (capable of maintaining $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- Decanting rack
- Centrifuge (capable of at least 2000 g, preferably refrigerated)
- Gamma counter
- Distilled or deionised water

Instruments

Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used. The counting efficiency of the instrument should be regularly checked as well as the background counts. It is recommended that the instrument be calibrated systematically. Consult the operations manual supplied by the instrument manufacturer for details of installation, use, maintenance and calibration.

Details of the procedure

1	Bring all reagents and samples to room temperature ($18\ldots 25^{\circ}\text{C}$) prior to use. Mix all reagents well by gentle inversion prior to use.
2	Label polystyrene test tubes in duplicate for NSB (non-specific binding), calibrators, controls, patient samples and total counts.
3	Pipette 50 µl of calibrator, control or patient sample into the appropriate tubes. Any patient sample or the 0 µg/l calibrator may be pipetted into the NSB tubes.
4	Pipette 200 µl of Tracer (red) into all tubes.
5	Pipette 200 µl of Antiserum (blue) into all tubes except NSB and total counts. Pipette 200 µl of distilled or deionised water into the NSB tubes.
6	Mix all tubes on a vortex mixer, cover with paraffin film and incubate for 2 hours at $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
7	Mix the Procollagen Separation Reagent thoroughly by gentle inversion. Add 500 µl to all tubes except total counts.
8	Mix the tubes using a vortex mixer and incubate for 30 minutes at room temperature ($18\ldots 25^{\circ}\text{C}$).
9	Centrifuge all tubes except total counts for 15 minutes at 2000 g at $4\ldots 20^{\circ}\text{C}$ (4°C is recommended).
10	Decant the supernatants from all tubes except total counts by simultaneous inversion. Gently blot tubes against absorbent material and allow to drain for a few seconds to remove any remaining liquid. Care should be taken not to decant any of the precipitate. Do not reinvert the tubes once they have been turned upright. Failure to decant and blot tubes may result in poor replication and erroneous values.
11	Count each tube in a gamma counter for 1 minute.
12	Calculate the results as described in the "Calculation of Results" section.

Assay procedure – summary

(All volumes given in µl)

	Total	NSB	Calibrator	Control and unknown
Pipette sample		50	50	50
Pipette tracer (red)	200	200	200	200
Pipette antiserum (blue)			200	200
Pipette distilled / deionised water		200		
Mix		x	x	x
Incubate for 2 hours at 37°C		x	x	x
Pipette separation reagent		500	500	500
Mix		x	x	x
Incubate for 30 min at room temperature (18...25°C)		x	x	x
Centrifuge for 15 min at 2000 g		x	x	x
Decant		x	x	x
Count 1 min	x	x	x	x

8. QUALITY CONTROL

An internal quality assurance programme is recommended for all clinical laboratories. For this reason, it is suggested that control sera in both the lower and upper portions of the calibration curve be analysed to enable the performance of the procedure to be monitored. The UniQ PINP RIA assay provides two control materials: PINP RIA Control 1 & 2. The expected ranges of the controls are indicated on a separate sheet provided with the assay. It is recommended that each laboratory establish its own acceptable ranges for the controls it uses. The mean of the control should fall within the acceptable range stated by Aidian. It is advised to use at least two separate kit lot numbers for the control value assignment. Once the control ranges have been established, controls should be run in duplicate with each assay.

9. RESULTS' INTERPRETATION

For automatic result processing spline function curve fitting is recommended. Results can also be produced manually on semi-log graph paper.

- **Calculate** the mean count for all calibrators, samples, controls and non-specific binding.
- **Calculate** the %B/B₀ from:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{calibrator or sample count} - \text{NSB}}{\text{calibrator 0 count} - \text{NSB}} \times 100$$

where B is the bound radioactivity of a sample or calibrator, B₀ is the bound radioactivity of the calibrator 0 and NSB is the radioactivity of the non-specific binding.

- **Draw** a calibration curve on semi-log graph paper with %B/B₀ values on the ordinate (Y axis) and PINP concentrations (µg/l) of the calibrators on the abscissa (X axis).

- **Determine** the PINP concentrations of the unknowns from the calibration curve.
- **Any sample reading lower than the lowest calibrator should be reported as such.**
- **Any sample reading higher than the highest calibrator should be diluted and re-assayed.** After dilution, values must be corrected for the dilution factor.

Fig. 1 Typical calibration curve.

This calibration curve is for illustration only.

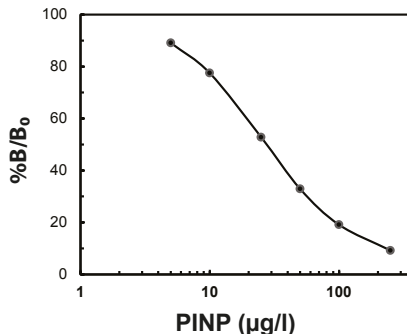


Table 1 Calculation of results using typical data.

This data is for illustration only and must not be used for the calculation of any sample result.

Tube	mean cpm	cpm-NSB	%B/B ₀	PINP (µg/l)
Total	50970			
NSB	845			
Cal 0	28330	27485		
Cal 5.0	25343	24498	89.1	
Cal 10	22143	21289	77.5	
Cal 25	15344	14499	52.8	
Cal 50	9897	9052	32.9	
Cal 100	6095	5250	19.1	
Cal 250	3379	2534	9.2	
Unkn 1	10725	9880	35.9	44.6
Unkn 2	4572	3727	13.6	157

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Results of this assay should be used in conjunction with other pertinent clinical information for making diagnostic and therapeutic decisions. Therefore, the UniQ PINP assay is not recommended for use as a screening procedure to detect the presence of osteoporosis in the general population.

When evaluating subsequent samples, collect the samples at the same time of the day, as there is a diurnal variation of PINP with the values being higher at night.

Type I collagen is also synthesised by fibroblasts and therefore can be found in loose connective tissues together with other collagen types. However, since bone is the major collagenous organ and also metabolically active throughout life, the majority of the circulating PINP is of osteoblast origin.²⁵

PINP is metabolised in the liver.²⁶ Severe liver disease may affect clearance from the circulation and give rise to elevated serum PINP levels.²⁷

As with most assays utilising secondary antibodies, samples containing antibodies (such as heterophilic antibodies) that react with rabbit/goat IgG may cause erroneous results.

11. EXPECTED VALUES

Due to ethnic, dietary and age variations, the reference limits given may not apply to all populations. The ranges of observations reported below are representative only, and do not necessarily reflect the ranges that will be observed in a particular clinical setting.

PINP values of apparently healthy white Finnish adults were measured with the UniQ PINP RIA kit. The non-parametric method recommended by IFCC was used to calculate the reference intervals for the upper and lower limits.²⁸ Each laboratory should establish its own representative expected values for the local population.

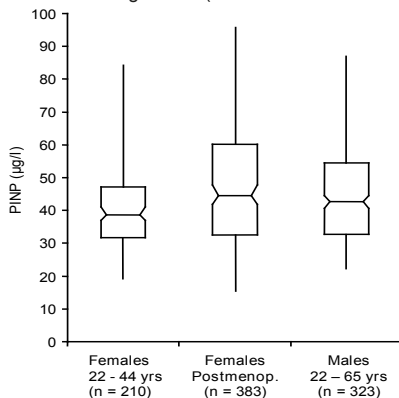
Table 2 Serum PINP expected values

	Female	Female Postmenopausal *	Male
Age, years	25–44	52–62	22–65
Number of subjects	210	383	323
Mean	42 µg/l	48 µg/l	45 µg/l
Median	39 µg/l	45 µg/l	43 µg/l
Reference interval**	19–83 µg/l	16–96 µg/l	22–87 µg/l
0.95-confidence intervals			
for lower reference limit	14–23 µg/l	15–19 µg/l	20–25 µg/l
for upper reference limit	71–96 µg/l	87–103 µg/l	77–94 µg/l

*Min. 3 years postmenopausal

**Reference interval = 0.025 & 0.975 fractiles

Fig. 2 Box-Whisker plots of the distribution of PINP concentrations in apparently healthy adults. The horizontal line in each box represents the median value while the lower and upper limits of the boxes indicate the interquartile ranges, i.e., values 25 % above and below the median. The tips of the whiskers show the reference range limits (0.025 & 0.975 fractiles).



The results presented above demonstrate that PINP concentrations in a population of postmenopausal women are elevated compared to concentrations in women aged 25–44 years ($p = 0.0005$, Mann Whitney). This increase in PINP reflects the increase in bone remodelling associated with oestrogen deficiency in a postmenopausal population compared to a younger population. However, there is considerable overlap in PINP concentrations in the two populations.

CLINICAL STUDIES

Bisphosphonate treatment

The usefulness of UniQ PINP RIA to monitor changes in bone remodelling during bisphosphonate treatment (10 mg daily alendronate) was studied in a multi-site, prospective, double blind placebo-controlled study in postmenopausal women of the US population with defined osteoporosis, at least 5 years since menopause.²⁹ Data were available from 124 patients randomised into two groups: 62 receiving the treatment (TRM) and 62 receiving placebo (CTR). All study subjects received 500 mg/d calcium supplementation. Patients were analysed at baseline and at 3, 6 and 12 months of treatment. Bone mineral density (BMD) was measured with dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) and intact PINP was measured by UniQ PINP RIA.

The data are presented in Table 3 and Figure 3. At baseline, the BMD was 0.740 ± 0.083 g/cm² (mean ± SD) in the CTR and 0.727 ± 0.104 g/cm² in the TRM group. In the TRM group the mean BMD increased by 6.0 % from baseline at 12 months. The change was significant at all time points compared to baseline (p < 0.0001). The increase in the CTR group was smaller and transient returning back to baseline by 12 months.

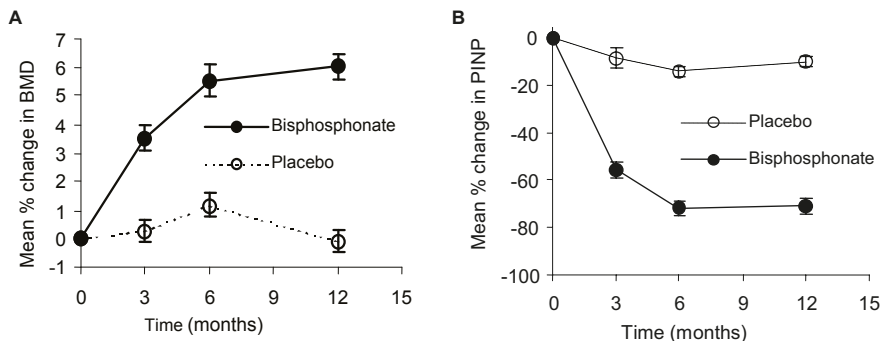
At baseline the concentration of PINP was 62.5 ± 18.5 µg/l in the CTR group and 61.1 ± 30.1 µg/l in the TRM group. The mean concentration of PINP in the TRM group decreased by 70.8 % at 12 months of treatment. At all three time points the decrease was significant (p < 0.0001) compared to baseline. The decrease in the CTR group, also receiving the calcium supplementation, was smaller, at 9.8 % at 12 months.

The changes observed in BMD and PINP during bisphosphonate treatment reflect the effects this treatment has on bone remodelling. The results were as expected and similar to earlier reports, which have shown significant decreases in PINP levels during bisphosphonate treatment.^{11, 30-31}

Table 3 Response expressed as a mean percentage change in BMD and PINP in patients receiving bisphosphonate or placebo

Test	Treatment group	Mean percentage change (SD) from baseline value		
		3 months	6 months	12 months
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	-0.1 (3.2)
	Bisphosphonate	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	-8.6 (25.9)	-14.0 (25.5)	-9.8 (27.4)
	Bisphosphonate	-55.4 (34.0)	-71.6 (15.6)	-70.8 (15.5)

Fig. 3 Response as mean percent change ($\pm$ SE bars) in (A) BMD and (B) PINP concentration in patients receiving bisphosphonate (●) or placebo (○).



In order to have clinical significance, the percentage change between two measurements must exceed both the analytical (CV_a) and intra-individual (CV_i) variation. This threshold is referred to as the minimum percentage change and it can be calculated as follows:

$$\text{Minimum percentage change} = \sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV_a^2 + CV_i^2)}$$

Several values for PINP have been published in literature. For example, Hannon and colleagues¹² have reported a minimum percentage change of 21 % for PINP.

Hormone replacement therapy

The ability of the UniQ PINP RIA to reflect changes in bone remodelling during hormone replacement therapy (HRT) in postmenopausal women was studied in a randomised, double blind dose-finding study.³²⁻³³ Study subjects were apparently healthy Finnish women at least 3 years since menopause. Data were available from the treatment arm of 44 subjects receiving the lowest dose of treatment: 1 mg oral oestradiol valerate and 2.5 mg oral medroxyprogesterone acetate daily. Patients were analysed at baseline and at 6 and 12 months of treatment. BMD was measured with dual-energy X-ray absorptiometry and intact PINP was measured using UniQ PINP RIA.

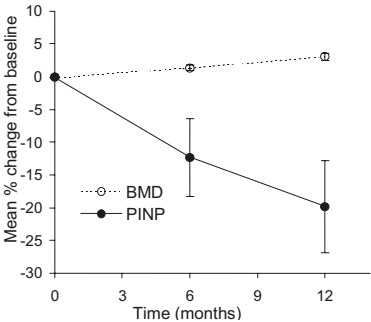
The data are presented in Table 4 and Figure 4. At baseline the BMD was 1.083 ± 0.182 g/cm² (mean $\pm$ SD) and the concentration of PINP was 42.2 ± 15.3 µg/l. At 6 months BMD had increased by mean 1.4 % and at 12 months the increase was 3.1 % from the baseline value. PINP decreased from the baseline value by 12.3 % at 6 months and by 19.8 % at 12 months. The changes in BMD and PINP were significant ($p < 0.002$) at both time points compared to the baseline value.

The changes observed in BMD and intact PINP during HRT reflect the effect this treatment has on bone remodelling even with the low dose treatment used in this study. The results were as expected and similar to earlier reports which all showed significant decreases in PINP levels during different types of hormone replacement therapies.^{12-13, 15}

Table 4 Response expressed as a mean percentage change in BMD and PINP concentration in postmenopausal patients receiving low dose combined hormone replacement therapy.

Test	Mean percent change (SD) from the baseline value	
	6 months	12 months
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Fig. 4 Response expressed as a mean percentage change ($\pm$ SE bars) in BMD (o) and PINP concentration (●) in postmenopausal women receiving low dose combined hormone replacement therapy.



Teriparatide treatment

Teriparatide, human parathyroid hormone (PTH) 1–34, of recombinant DNA origin, stimulates bone formation. The ability of the UniQ PINP RIA to reflect changes in bone remodelling following teriparatide therapy in the management of osteoporosis was studied at 19 clinical sites using a randomised double blind design.³⁴ Study subjects were ambulatory post-menopausal women with defined osteoporosis, at least 5 years since menopause. A subset of subjects received once-daily doses of 20 µg teriparatide with daily supplementation of calcium (1000 mg) and vitamin D (400–800 IU) throughout the study. Retrospectively, data were collected from 62 patients age 64.9 ± 7.8 years (mean ± SD) receiving teriparatide and having full sets of BMD and PINP results available at the scheduled sampling points. Lumbar spine (L1–L4) BMD was measured in all patients by DXA using Lunar or Hologic densitometers at baseline and 3, 6, 12 and 18 months of teriparatide treatment. Intact PINP was measured at baseline and 1, 3, 6 and 12 months of treatment using the UniQ PINP RIA assay.

Teriparatide therapy resulted in a mean BMD increase throughout the study period with the increases being statistically significant at all time points ($p < 0.0001$) as compared with baseline. Mean BMD increased by 0.025 g/cm² at 3 months, 0.039 g/cm² at 6 months, 0.061 g/cm² at 12 months and 0.079 g/cm² at 18 months.

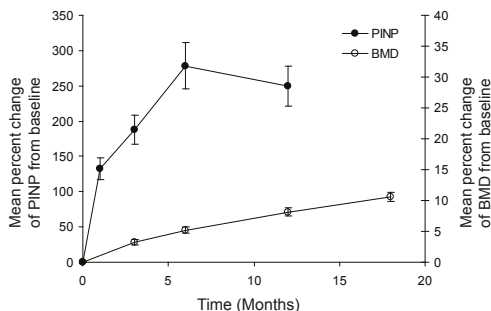
The mean PINP concentration increased by 59 µg/l from baseline at 1 month, 82 µg/l at 3 months, 117 µg/l at 6 months and 103 µg/l at 12 months. The increase in the PINP concentration compared to baseline was statistically significant at all time points ($p < 0.0001$).

The percentage change from baseline for BMD and PINP was calculated at each time point. The mean percentage changes are shown in Table 5 and graphically depicted in Figure 5. The mean values for PINP and BMD increased in response to the teriparatide treatment. PINP peaked at 6 months followed by a slight decline at 12 months as compared to the 6-month time point. Mean BMD increased in response to treatment with the maximum value being observed at the end of the study period.

Table 5 Response expressed as a mean percentage change ($\pm$ SD) in BMD and PINP concentration in 62 postmenopausal women with osteoporosis receiving once-daily doses of 20 μ g teriparatide.

Test	Change (mean $\pm$ SD)	Change (mean $\pm$ SD)	Change (mean $\pm$ SD)	Change (mean $\pm$ SD)	Change (mean $\pm$ SD)
	1 month	3 months	6 months	12 months	18 months
BMD	NA	3.3 $\pm$ 3.4 %	5.2 $\pm$ 3.8 %	8.1 $\pm$ 5.1 %	10.6 $\pm$ 5.6 %
PINP	132.6 $\pm$ 118.2 %	187.8 $\pm$ 164.2 %	278.5 $\pm$ 257.1 %	249.5 $\pm$ 221.7 %	NA

Fig. 5 Response expressed as a mean percentage change ($\pm$ SE bars) in BMD and PINP concentration in 62 postmenopausal women with osteoporosis receiving once-daily doses of 20 μ g teriparatide



Changes observed in BMD and intact PINP levels reflect the anabolic effect of teriparatide therapy on bone remodeling. These results were as expected and similar to other reports, which have shown significant increases in PINP levels during teriparatide treatment.^{17–20} Partly based on the same clinical material as the above study³⁴, an algorithm for using PINP to monitor patients treated with teriparatide has been developed, which underlines the clinical utility of PINP measurements in the management of postmenopausal osteoporosis.²¹

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results presented below were obtained at Aidian and represent typical performance data.

Linearity

The linearity of the UniQ PINP RIA assay was studied by diluting samples with the 0 µg/l calibrator of the kit. The recovery percentage was calculated by dividing the measured concentration by the expected concentration and multiplying by 100.

Table 6 Linearity of the PINP assay

Sample	Dilution	Expected (µg/l)	Measured mean (µg/l, n=4)	Calculated for undiluted (µg/l)	Recovery (%)
1	Neat	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			Mean SD CV %	189.3 12 6.3	
2	Neat	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			Mean SD CV %	79.9 2.4 3	

Precision

Intra- and inter-assay precision of the assay was determined using serum pools and control samples containing different concentrations of PINP.

Table 7 Intra-assay / Inter-assay precision

Intra-assay precision of 18 or 20 replicates			Inter-assay precision of 10 duplicate determinations		
Sample	Mean (µg/l)	CV (%)	Sample	Mean (µg/l)	CV (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Recovery

The recovery was studied by adding known amounts of purified PINP antigen to a sample containing 19.1 µg/l of endogenous PINP. The sample was measured in duplicate with the UniQ PINP RIA assay and the recovery percentage was calculated. The recovery percentage equals the increase in concentration divided by the spike concentration multiplied by 100.

Table 8 The recovery of PINP assay

Spike (µg/l)	Measured (µg/l)	Increase (µg/l)	Recovery (%)
–	19.1	–	–
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Specificity

The intact UniQ PINP RIA assay is highly specific for intact trimeric forms of N-terminal propeptide of type I procollagen. The small molecular weight monomeric degradation products of the PINP propeptide (Col1) are detected at low levels (cross-reactivity of 2.7 %). UniQ PINP RIA does not cross-react with the N-terminal propeptide of type III procollagen (PIIINP).

Interfering substances

Serum bilirubin concentration < 400 µmol/l (< 23 mg/dl) does not interfere with the assay. Serum haemoglobin concentration up to 5 g/l (500 mg/dl) or triglycerides up to 30 g/l (3000 mg/dl) do not interfere with the assay.

Detection limit

The detection limit of the UniQ PINP RIA assay was determined by measuring 20 replicates of the 0 µg/l calibrator and the calibration curve (4 replicates) three times. The minimum detectable concentration of PINP in the assay was less than 2 µg/l, defined as twice the standard deviation of the 0-binding value.

Measurement range

The measurement range of the UniQ PINP RIA is 5–250 µg/l.

13. TRACEABILITY

The measurand (analyte) in the UniQ PINP RIA Calibrators is traceable to the manufacturer's working calibrators which are prepared from highly purified PINP whose value is assigned using amino acid composition analysis.

14. DISPOSAL

- Dispose of contents according to national and local law.
- All patient samples and controls should be handled and disposed of as potentially infectious material.
- Radioactive waste material must be discarded according to the applicable laws.
- Materials of the components:
 - Paper: Instructions for use
 - Cardboard: Kit box
 - Plastic: Separation reagent bottle, vial caps
 - Rubber: Stoppers
 - Glass: tracer, antiserum, calibrator, control vials
 - Foam rubber
- When used in accordance with Good Laboratory Practice, good occupational hygiene and the instructions for use, the reagents supplied should not present a hazard to health.

UniQ® PINP RIA

Intaktes N-terminales Propeptid von Typ I Prokollagen, Radioimmunoassay Kit

1. VERWENDUNGSZWECK

UniQ PINP RIA ist ein quantitativer Radioimmunoassay zur Bestimmung des intakten aminoterminalen Propeptids des Typ I Prokollagens, eines Markers der Osteoblasten-Aktivität, in Humanserum. Der Test dient der Therapie- und Verlaufskontrolle einer postmenopausalen Osteoporose. **Für in-vitro Diagnostik.**

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das von den Fibroblasten und Osteoblasten gebildete Typ I Kollagen ist das am häufigsten vorhandene Kollagen des Körpers und das einzige Kollagen des mineralisierten Knochens, wo es mehr als 90% der organischen Matrix bildet. Da der Knochen das wichtigste kollagene Organ ist und lebenslang eine hohe metabolische Aktivität beibehält, wird das Typ I Kollagen zum überwiegenden Teil von den Osteoblasten des Knochens gebildet.

Das Kollagen des Knochens stammt von einem größeren Protein ab, dem Typ I Prokollagen. Es ist aus drei Aminosäureketten aufgebaut, die einander umwinden und eine stabähnliche Triplehelix bilden. Das Typ I Prokollagen trägt an beiden Termini seines Moleküls jeweils ein Propeptid. Beide werden von spezifischen Proteinasen abgespalten und anschließend werden die dabei gebildeten Kollagen-Moleküle zu Kollagenfasern zusammengebaut. Die beiden Propeptide können im Blut nachgewiesen werden. Sie widerspiegeln dort die Bildungsrate des Typ I Kollagens. Der UniQ PINP RIA misst die Konzentration im Serum des aminoterminalen Propeptids vom Typ I Prokollagen (PINP).¹ Da die Konzentration dieses Propeptids zur Menge an neu im Knochen abgelagertem Kollagen direkt proportional ist, kann es als Marker der Knochenformation benutzt werden.

Bei der Knochenformation wird zunächst die Knochenmatrix produziert; erst dann erfolgt die Mineralisierung. PINP ist folglich ein früher Marker der Knochenformation. Die alkalische Phosphatase des Knochens, ein in den Prä-Osteoblasten und Osteoblasten vorhandenes Enzym der Zellmembran, ist ein weiterer Frühparameter der Osteoblasten-Aktivität.² Das bei der Mineralisierung des Knochens gebildete Osteocalcin ist ein späterer Parameter der Osteoblastendifferenzierung.³

Das Knochengewebe ist außergewöhnlich metabolisch aktiv und wird lebenslang ständig umgebaut. Dieser Knochenumbau wird von zwei gegensätzlich ablaufenden Prozessen bestimmt: der Knochenformation und der Knochenresorption. Beide Prozesse sind unter normalen Bedingungen eng gekoppelt. Stoffwechselerkrankungen des Knochens zeigen ein charakteristisches Ungleichgewicht des Knochenumsatzes und führen oft zu einer Entkopplung zwischen Knochenformation und -resorption.⁴ PINP, ein Marker des Typ I Kollagenumsatzes, eignet sich hervorragend für Untersuchungen des Knochenumbaus unter normalen und anomalen Bedingungen. Mit dem UniQ PINP Assay kann ein erhöhter Knochenumsatz bei postmenopausalen Frauen mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden⁵⁻⁹. Der Test kann daher besonders zur Beurteilung der Wirksamkeit einer anti-resorptiven und anabolischen Therapie auf den Knochenstoffwechsel geeignet sein.¹⁰⁻²¹ Die Bestimmung von PINP wurde auch zum Nachweis eines erhöhten Typ I Kollagenumsatzes bei Knochenkrankungen wie Morbus Paget²²⁻²⁴.

3. TESTPRINZIP

UniQ PINP RIA ist ein kompetitiver Radioimmunoassay. Eine bekannte Menge an radioaktiv markiertem PINP konkurriert mit einer unbekannten Menge an nicht-markiertem PINP in der Probe um die in einer limitierten Menge vorhandenen, hochaffinen Bindungsstellen der polyklonalen PINP-Antikörper vom Kaninchen. Ein zweiter, gegen Kaninchen-IgG gerichteter und an Kaolinpartikel gebundener Antikörper, dient der Trennung von Antikörper-gebundenem PINP und freiem PINP. Die Radioaktivität von gebundenem Tracer-Antigen wird in einem Gammacounter gemessen. Die Menge an radioaktiv markiertem PINP ist umgekehrt proportional zur Menge an PINP in der Probe. Die PINP-Konzentrationen der Proben werden an einer Standardkurve abgelesen, die anhand der gleichzeitig erfolgten Bestimmung der UniQ PINP RIA Kalibratoren von 0 bis 250 µg/l PINP erstellt wurde.

4. REAGENZIE

UniQ® PINP RIA, Kat. Nr. 67034

Name und Origin des Kit-Komponents	Symbol	 100	Stabilität bei 2...8°C	
			Ungeöffnet	Geöffnet
Tracer	Ag ¹²⁵ I	22 ml Radioaktivität < 200 kBq.	Bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum	6 Wochen
Antiserum ORIG RAB	Ab	22 ml	Bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum	6 Wochen
Kalibrator	CAL xxµg/l	7 x 0.5 ml	Bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum	6 Wochen
Kontrolle ORIG HUM	CONTROL #	2 x 1.0 ml	Bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum	6 Wochen nach Rekonstitution
Prokollagen Trennreagenz	REAG SEPAR	60 ml	Bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum	6 Wochen
Gebrauchsinformation				

Die Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel: Siehe Abschnitt 5 "Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen".

Aufbereitung der Reagenzien

Die Kontrollen sind lyophilisiert. Alle andere Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Beide Kontrollfläschchen vor dem Öffnen auf Raumtemperatur (18...25°C) bringen. Inhalt in jedem Fläschchen mit 1,0 ml destilliertem oder entionisiertem Wasser rekonstituieren. Fläschchen zustöpseln und Inhalt sorgfältig mischen (schwenken oder kippen). Schaumbildung vermeiden. Vor Gebrauch 30 Minuten stehen lassen.

Verfall der Reagenzien

Veränderungen im Aussehen der Reagenzien oder in der Neigung der Standardkurve bzw. Werte der Kontrollserien außerhalb der vom Hersteller angegebenen Bereiche können Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Reagenzien sein. Reagenzien mit möglichen Verfallserscheinungen sollten nicht benutzt werden.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Gesundheits- und Sicherheitsinformationen

- Nur zur *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Alle Patientenproben und Kontrollen sollten als potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Kontrollen enthalten Material menschlichen Ursprungs, das in Bezug auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das humane Immundefizienz-Virus (HIV 1 und 2), das Hepatitis C Virus (HCV) und das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) getestet und als negativ bestätigt wurde. Als Vorsichtsmaßnahme das Produkt wie potentiell infektiöses Material handhaben.
- Lyophilisierte Reagenzien enthalten Natriumazid in einer Konzentration von <1 % (Aqu. Chron. 3). Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung (H412). Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase (EUH032). Freisetzung in die Umwelt vermeiden (P273). Inhalt entsprechend nationalem und lokalem Recht zuführen (P501). Azide können mit Metallrohren reagieren, indem sie explosive Stoffe bilden. Die Bildung von Aziden kann vermieden werden, indem mit großen Mengen Wasser nach Wegschütten des Reagenzes gespült wird.
- Rekonstituierte und flüssige Reagenzien enthalten Natriumazid in Konzentrationen < 0,1 %, die nicht als gesundheitsgefährdend eingestuft sind.
- Das Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit $T_{1/2}$ von 60 Tagen), das 35,5 keV Gammastrahlung und 27–32 keV Röntgenstrahlung aussendet. In diesem Kit enthaltenes radioaktives Material darf ausschließlich von Ärzten, klinischen Labors, Forschungsinstituten oder Krankenhäusern in Empfang genommen, erworben, in Besitz genommen und ausschließlich für *In-vitro*- oder klinische oder Labortests verwendet werden, die keine innere oder äußerliche Verabreichung des Materials, oder der davon ausgehenden Strahlung am Menschen oder an Tieren beinhaltet. Sämtliche radioaktiven Materialien sollten ausschließlich in speziell dafür vorgesehenen Bereichen gelagert und gehandhabt werden. Der Erwerb, die Lagerung, die Verwendung oder der Austausch radioaktiver Produkte unterliegt den im Land des Anwenders geltenden Gesetzen.
- Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Nach Hautkontakt bitte sofort mit viel Wasser waschen und dekontaminieren Sie die betroffenen Flächen. Folgen Sie dabei den Richtlinien Ihrer Institution betreffend einer versehentlichen Freisetzung.
- Verschüttungen von radioaktivem Material sollten umgehend mit einem Reinigungsmittel entfernt werden und das kontaminierte Reinigungsmaterial sollte dem Behälter für radioaktive Abfälle zugeführt oder gemäß den Empfehlungen des Amts für Strahlenschutz gehandhabt werden.
- Radioaktive Abfälle müssen in Übereinstimmung mit den geltenden Gesetzen entsorgt werden. Befolgen Sie die Strahlenschutzbestimmungen und -verfahren Ihrer Einrichtung in Bezug auf die Handhabung, Lagerung und Entsorgung von radioaktivem Material.

Analytische Vorsichtsmaßnahmen

- Das Produkt nicht nach dem Verfallsdatum auf der äußeren Verpackung verwenden.
- Die Stabilitätszeit für geöffnete Reagenzien nicht überschreiten.
- Keine Komponenten unterschiedlicher Chargennummern oder verschiedener Tests verwenden.

6. PROBENGEGWINNUNG UND VORBEREITUNG

Zur Probenentnahme sind keine besonderen Vorbereitungen seitens des Patienten erforderlich. Der Test sollte mit Serum aus einer venösen Blutprobe durchgeführt werden. Bei der Venenpunktion sind die üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Der Test sollte nicht mit Plasma durchgeführt werden.

Stark lipämische, hämolytische oder mikrobiell kontaminierte Seren sollten nicht getestet werden.

Probenaufbereitung und Lagerung

Nach der Probenentnahme das Blut gerinnen lassen und dann das Serum durch Zentrifugieren abtrennen. Die Serumproben können bis 5 Tage bei 2...8°C und länger bei mindestens -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren oder Auftauen ist zu vermeiden.

Proben mit hohen PINP-Konzentrationen können mit 0,9 % Kochsalzlösung verdünnt werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Siehe den Abschnitt 4 "Reagenzien" für eine Liste der Reagenzien.

Erforderliches, aber nicht geliefertes Material

- Pipetten (für die genaue Abgabe von 50 µl, 200 µl, 500 µl und 1000 µl)
- Röhrchen (Polystyrol, Z.B. 12 X 75 mm)
- Saugfähiges Papier
- Parafilm
- Rüttler Typ Vortex
- Wasserbad (für eine Konstante Temperatur von 37±1°C),
- Ständer zum Dekantieren
- Zentrifuge (für mindestens 2000 G, möglichst mit Kühlung),
- Gammacounter
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser

Geräte

Jeder für die Messung von ¹²⁵I geeignete Gammacounter kann benutzt werden. Der Wirkungsgrad des Geräts wie der Background sollten regelmäßig überprüft werden. Es empfiehlt sich, das Gerät systematisch zu kalibrieren. Hinweise zur Installation, Bedienung, Wartung und Kalibrierung entnehmen Sie bitte dem Bedienerhandbuch des Herstellers.

Einzelheiten der Testdurchführung

1	Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18...25°C) bringen und durch leichtes Schwenken sorgfältig mischen.
2	Röhrchen aus Polystyrol für die Doppelbestimmung der NSB (unspezifischen Bindung), Kalibratoren, Kontrollen, Patientenproben und Totalaktivität beschriften .
3	Von den Kalibratoren, Kontrollen, Patientenproben jeweils 50 µl in die dafür vorgesehenen Röhrchen pipettieren . Eine beliebige Patientenprobe oder den Nullkalibrator in die NSB-Röhrchen geben.
4	In jedes Röhrchen 200 µl Tracer (rot) pipettieren .
5	In jedes Röhrchen, außer den Röhrchen für die NSB und Totalaktivität, 200 µl Antiserum (blau) pipettieren . In jedes NSB-Röhrchen 200 µl destilliertes oder entionisiertes Wasser geben.
6	Jedes Röhrchen am Rüttler mischen , mit Parafilm verschließen und für 2 Stunden bei 37±1°C in einem Wasserbad inkubieren .

7	Das Prokollagen Trennreagenz durch behutsames Kippen sorgfältig mischen und 500 µl jedem Röhrchen, außer den Röhrchen für die Totalaktivität, hinzufügen .
8	Die Röhrchen am Rüttler mischen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren .
9	Mit Ausnahme der Röhrchen für die Totalaktivität, jedes Röhrchen für 15 Minuten bei 2000 g und 4...20°C (4°C wird empfohlen) zentrifugieren .
10	Den Überstand in den Röhrchen gleichzeitig dekantieren (auskippen; ausgenommen der Röhrchen für die Totalaktivität). Umgekehrt für einige Sekunden auf saugfähiges Papier stellen, um alle Restflüssigkeit zu entfernen. Darauf achten, dass kein Präzipitat beim Dekantieren verloren geht. Röhrchen nach dem Aufrichten nicht nochmals Umkehren . Unsachgemäßes Dekantieren und Blotten kann schlechte Doppelwerte und falsche Ergebnisse bewirken.
11	Jedes Röhrchen in einem Gammacounter für mindestens 1 Minute zählen .
12	Die Ergebnisse wie im Abschnitt "Auswertung der Ergebnisse" beschrieben auswerten .

Testdurchführung – Zusammenfassung

(alle Mengenangaben in µl)

	Total	NSB	Kalibratoren	Kontrollen und Unbekannt
Proben pipettieren		50	50	50
Tracer (rot) pipettieren	200	200	200	200
Antiserum (blau) pipettieren			200	200
Destilliertes/entionisiertes Wasser pipettieren		200		
Vortexen		x	x	x
2 Std. bei 37°C inkubieren		x	x	x
Trennreagenz pipettieren		500	500	500
Vortexen		x	x	x
30 Min. bei RT (18...25°C) inkubieren		x	x	x
15 Min. bei 2000 g zentrifugieren		x	x	x
Dekantieren		x	x	x
1 Min. zählen	x	x	x	x

8. QUALITÄTSKONTROLLE

Laborinterne Programme zur Qualitätssicherung sollten von allen medizinischen Laboratorien durchgeführt werden. U.a. sollte die Testdurchführung mit Hilfe von Kontrollseren im unteren und oberen Referenzbereich überprüft werden. Der UniQ PINP RIA enthält zwei Kontrollen: PINP RIA Control 1 & 2. Die erwarteten Bereiche der Kontrollen sind auf einem gesonderten Blatt aufgeführt, das dem Test beiliegt. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Akzeptanzbereiche für die verwendeten Kontrollen erstellt. Der Mittelwert dieser Kontrollen sollte in den von Aidian angegebenen Akzeptanzbereichen liegen. Für die Bestimmung des Mittelwerts der Kontrollen wird empfohlen, diesen anhand von mindestens zwei unterschiedlichen Kitchargen zu erstellen. Sobald die Kontrollbereiche erstellt worden sind, sollten bei jedem Ansatz die Kontrollen in Doppelbestimmung mitgeführt werden.

9. AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE

Für eine Computer-gestützte Auswertung der Ergebnisse empfiehlt sich eine Kurvenanpassung mittels dem Modell der Spline-Funktion. Die Auswertung kann auch manuell mit Hilfe von semilogarithmischen Millimeterpapier durchgeführt werden.

- Für die Kalibratoren, Proben, Kontrollen und NSB die mittlere Zählrate **berechnen**.
- $\%B/B_0$ anhand der folgenden Gleichung **berechnen**:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Zählrate Kalibrator oder Probe} - \text{NSB}}{\text{Zählrate Nullkalibrator} - \text{NSB}} \times 100$$

wobei B die gebundene Radioaktivität einer Probe oder eines Kalibrators, B_0 die gebundene Radioaktivität des Nullkalibrators und NSB die unspezifisch gebundene Radioaktivität darstellen.

- Auf semilogarithmischem Papier eine Standardkurve **zeichnen**, indem die $\%B/B_0$ -Werte der einzelnen Kalibratoren auf der Ordinate (y-Achse) gegen die entsprechenden PINP-Konzentrationen ($\mu\text{g/l}$) der Kalibratoren auf der Abszisse (x-Achse) aufgetragen werden.
- Die PINP-Konzentrationen der Proben durch Interpolation ihrer $\%B/B_0$ -Werte auf der Standardkurve **ablesen**.
- **Proben, deren Wert unterhalb des niedrigsten Standards liegt, sind so anzugeben.**
- **Proben, deren Wert oberhalb des höchsten Standards liegt, sollten verdünnt und nochmals bestimmt werden.** Die Werte der verdünnten Proben müssen um dem Verdünnungsfaktor korrigiert werden.

Abbildung 1

Typische Standardkurve.

Die Kurve dient nur als Beispiel.

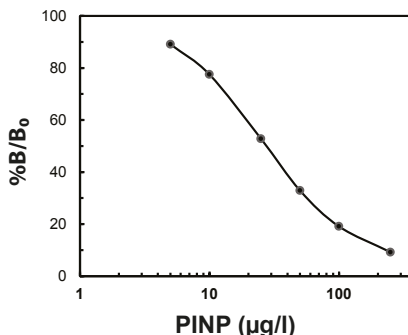


Tabelle 1

Berechnungsbeispiel anhand typischer Daten.

Diese Daten dienen nur als Beispiel und dürfen nicht zur Berechnung eines Probenergebnisses benutzt werden.

Röhrchen	MW cpm	Cpm- NSB	%B/B ₀	PINP (µg/l)
Total	50970			
NSB	845			
Kal. 0	28330	27485		
Kal. 5	25343	24498	89.1	
Kal. 10	22143	21289	77.5	
Kal. 25	15344	14499	52.8	
Kal. 50	9897	9052	32.9	
Kal. 100	6095	5250	19.1	
Kal. 250	3379	2534	9.2	
Unbekannt 1	10725	9880	35.9	44.6
Unbekannt 2	4572	3727	13.6	157

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Ergebnisse dieses Tests sollten für das weitere diagnostische und therapeutische Vorgehen nur in Verbindung mit anderen relevanten klinischen Informationen benutzt werden. Der UniQ PINP Assay wird daher nicht zum Osteoporose-Screening in der Allgemeinbevölkerung empfohlen.

Die PINP-Werte zeigen eine deutliche zirkadiane Rythmik mit einem Konzentrationsmaximum nachts. Probenabnahmen vom selben Patienten sollten daher stets zur gleichen Tageszeit erfolgen.

Typ I Kollagen wird auch von Fibroblasten gebildet und kommt daher neben anderen Kollagenarten auch im Bindegewebe vor. Da jedoch die Knochen das wichtigste kollagene Organ darstellen und auch lebenslang metabolisch aktiv sind, stammt PINP in der Blutzirkulation überwiegend von den Osteblasten ab.²⁵

PINP wird in der Leber verstoffwechselt.²⁶ Bei schweren Lebererkrankungen kann die PINP-Clearance aus der Blutbahn beeinträchtigt sein mit daraus resultierenden, erhöhten PINP-Spiegeln.²⁷

Wie bei den meisten Tests die Zweitantikörper benutzen, können gegen Kaninchen-/Ziegen-IgG gerichtete Antikörper (z.B. heterophile Antikörper) die Ergebnisse verfälschen.

11. ERWARTETE WERTE

Die erwarteten Werte können in Abhängigkeit der Ethnie, Diät und dem Alter schwanken. Die nachfolgend dargestellten Werte sind daher nur annähernd repräsentativ und nicht unbedingt auf klinische Kollektive übertragbar.

Die PINP-Werte im Serum von offenbar gesunden, weißen finnischen Erwachsenen wurden mit dem UniQ PINP RIA bestimmt. Die Normbereiche und Vertrauensbereiche der oberen und unteren Grenzwerte wurden mittels nicht-parametrischer Methoden entsprechend den Empfehlungen der IFCC ermittelt.²⁸

Jedes Labor sollte eigene, für die Bevölkerung in seinem Einzugsbereich repräsentative erwartete Werte erstellen.

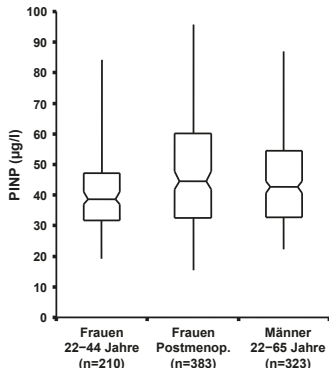
Tabelle 2 Erwartete PINP- Werte im Serum

	Frauen	Frauen Postmenopausal*	Männer
Alter, Jahre	25–44	52–62	22–65
Zahl der Probanden	210	383	323
Mittelwert	42 µg/l	48 µg/l	45 µg/l
Medianwert	39 µg/l	45 µg/l	43 µg/l
Normbereich**	19–83 µg/l	16–96 µg/l	22–87 µg/l
0,95-Vertrauensbereiche			
für unteren Grenzwert	14–23 µg/l	15–19 µg/l	20–25 µg/l
für oberen Grenzwert	71–96 µg/l	87–103 µg/l	77–94 µg/l

* Mindestens 3 Jahre nach Menopause

**Normbereich = 0,025 & 0,975 Perzentile

Abbildung 2 Box-Whisker-Plots der Verteilung der PINP-Konzentrationen bei offenbar gesunden Erwachsenen. Die Box reicht von der oberen zur unteren Quartile, d.h. zeigt den Bereich der Werte 25% über bzw. unter dem Medianwert (der horizontale Strich). Die Spitzen der Whiskers (der senkrechten Linien) zeigen die Grenzen der Normbereiche (0,025 & 0,975 Perzentile).



Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die PINP-Konzentrationen bei einem Kollektiv aus postmenopausalen Frauen im Vergleich zu den Konzentrationen bei Frauen im Alter 25–44 Jahre erhöht sind ($p = 0,0005$, Mann Whitney). Dieser PINP-Anstieg widerspiegelt den im Vergleich zu einem jüngeren Kollektiv vorhandenen, mit einem Oestrogenmangel einher gehenden, gesteigerten Knochenumbau in einem postmenopausalem Kollektiv. Allerdings überschneiden sich die PINP-Konzentrationen der beiden Kollektive deutlich.

KLINISCHE STUDIEN

Bisphosphonat-Behandlung

Die Wertigkeit des UniQ PINP RIAs bei der Verlaufsbeobachtung von Veränderungen im Knochenumbau während einer Bisphosphonat-Behandlung (Alendronat, 10 mg täglich) wurde in einer prospektiv und doppelblind geführten, Placebo-kontrollierten Multizenterstudie bei postmenopausalen (mindestens 5 Jahre) US-amerikanischen Frauen mit manifester Osteoporose untersucht.²⁹ 124 Patienten wurden in zwei Gruppen randomisiert: 62 erhielten die spezifische Behandlung (TRM) und 62 erhielten Placebo (CTR). Alle Studienteilnehmer erhielten 500 mg/Tag Calcium-Supplement. Die Patienten wurden vor sowie im Behandlungszeitraum nach 3, 6 und 12 Monaten untersucht. Die Knochendichte (BMD) wurde mittels der Dual-Energy x-Ray Absorptiometrie (DXA/Röntgen-Absorptionsmessung) und intaktes PINP mit UniQ PINP RIA gemessen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und Abbildung 3 dargestellt. Vor Behandlung war die BMD $0,740 \pm 0,083 \text{ g/cm}^2$ (MW $\pm$ SD) bei der Gruppe CTR und $0,727 \pm 0,104 \text{ g/cm}^2$ bei der Gruppe TRM. Bei der TRM-Gruppe stieg der BMD-Mittelwert um 6,0 % nach 12 Monaten. Zu allen Zeitpunkten war der Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ($p < 0,0001$). Der Anstieg war bei der CTR-Gruppe weniger ausgeprägt und von kurzer Dauer; nach 12 Monaten waren die Ausgangswerte wieder erreicht.

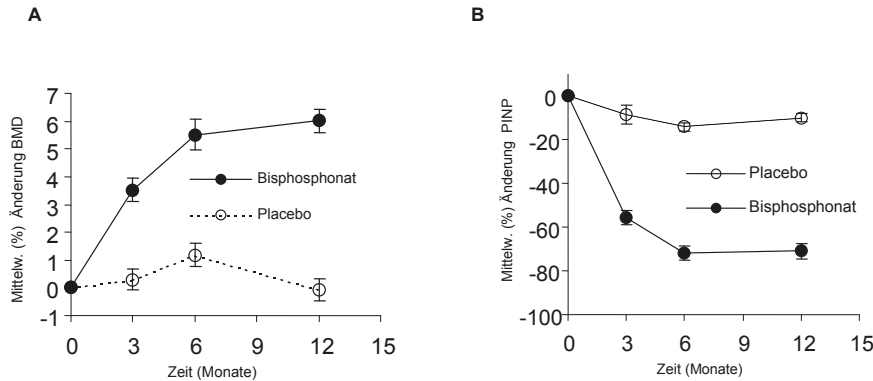
Vor Behandlung war die PINP-Konzentration $62,5 \pm 18,5 \text{ µg/l}$ bei der CTR-Gruppe und $61,1 \pm 30,1 \text{ µg/l}$ bei der TRM-Gruppe. Die mittlere PINP-Konzentration verzeichnete nach 12 Monaten Behandlung bei der TRM-Gruppe einen Abfall um 70,8 %. Der Abfall war im Vergleich zum Ausgangswert zu allen drei Zeitpunkten signifikant ($p < 0,0001$). Die Absenkung bei der CTR-Gruppe, die ebenfalls das Calciumsupplement erhielt, war mit 9,8 % nach 12 Monaten weniger deutlich.

Die während der Bisphosphonat-Behandlung beobachteten BMD- und PINP-Veränderungen widerspiegeln die Auswirkungen dieser Behandlung auf den Knochenumbau. Die Ergebnisse entsprachen den Erwartungen und bestätigten frühere Berichte eines signifikanten Abfalls der PINP-Spiegel während Behandlung mit Bisphosphonaten^{11, 30-31}

Tabelle 3 Mittlere prozentuale Veränderungen von BMD und PINP bei mit Bisphosphonat oder Placebo behandelten Patienten.

Test	Behandlung	Mittlere prozentuale Veränderung (SD) vom Ausgangswert		
		3 Monate	6 Monate	12 Monate
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	-0.1 (3.2)
	Bisphosphonat	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	-8.6 (25.9)	-14.0 (25.5)	-9.8 (27.4)
	Bisphosphonat	-55.4 (34.0)	-71.6 (15.6)	-70.8 (15.5)

Abbildung 3 Mittlere prozentuale Veränderung (± SE-Balken) der (A) BMD und (B) PINP-Konzentration bei mit Bisphosphonat (●) oder Placebo (○) behandelten Patienten.



Für eine klinische Signifikanz muss die prozentuale Veränderung zwischen den beiden Messungen größer sein als die analytische (CV_a) und die intra-individuelle (CV_i) Varianz. Dieser Schwellwert wird als "Geringste Prozentuale Veränderung" bezeichnet und kann wie folgt berechnet werden:

$$\text{Geringste Prozentuale Veränderung} = \sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV_i^2 + CV_a^2)}$$

Für PINP sind mehrere Werte veröffentlicht worden; so haben beispielsweise Hannon und Mitarbeiter 12 einen Wert der "Geringsten Prozentualen Veränderung" von 21% für PINP veröffentlicht.

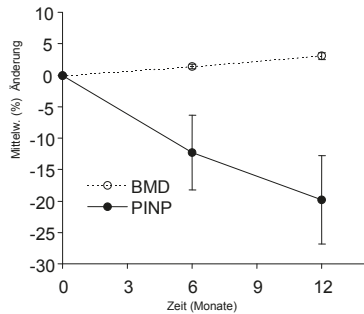
Hormonsubstitution

Die Fähigkeit des UniQ PINP RIAs, Veränderungen im Knochenumbau bei postmenopausalen Frauen unter Hormonsubstitution (HRT) zu widerspiegeln, wurde in einer prospektiven, doppelblind geführten Dose-finding Studie untersucht.³²⁻³³ Die Studienteilnehmer waren offenbar gesunde finnische Frauen mit wenigstens 3jähriger Postmenopause. Die Daten wurden von 44, mit der niedrigsten Dosis – täglich oral 1 mg Estradiolvalerat und 2,5 mg Medroxyprogesteronacetat – behandelten Frauen ermittelt. Die Frauen wurden vor Behandlung und im Behandlungszeitraum nach 6 und 12 Monaten untersucht. BMD wurde mit der Dual-Energy x-Ray Absorptiometrie/Röntgen-Absorptionsmessung) und intaktes PINP mit UniQ PINP RIA gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und Abbildung 4 dargestellt. Vor Behandlung waren die BMD $1,083 \pm 0,182 \text{ g/cm}^2$ (MW $\pm$ SD) und die PINP-Konzentration $42,2 \pm 15,3 \text{ }\mu\text{g/l}$. Nach 6 Monaten wurde für BMD ein mittlerer Anstieg um 1,4 % und nach 12 Monaten um 3,1 % vom Ausgangswert verzeichnet. PINP nahm im Vergleich zum Ausgangswert nach 6 Monaten um 12,3 % und nach 12 Monaten um 19,8 % ab. Die BMD- und PINP-Veränderungen waren im Vergleich zum Ausgangswert zu beiden Zeitpunkten signifikant ($p < 0,002$). Die während HRT beobachteten BMD- und PINP-Veränderungen widerspiegeln die Auswirkungen dieser Behandlung auf den Knochenumbau trotz der in dieser Studie verwendeten, niedrigen Behandlungsdosis. Die Ergebnisse entsprachen den Erwartungen und bestätigten frühere Berichte eines signifikanten Abfalls der PINP-Spiegel während Substitution mit verschiedenen Hormonpräparaten.^{12-13, 15}

Tabelle 4 Mittlere prozentuale Veränderungen von BMD und PINP bei Patienten unter Hormonsubstitution in niedriger Dosis.

Test	Mittlere prozentuale Veränderung (SD) vom Ausgangswert	
	6 Monate	12 Monate
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Abb. 4 Mittlere prozentuale Veränderung ($\pm$ SE-Balken) der BMD- (○) und PINP-Konzentration (●) bei postmenopausalen Frauen unter Hormonsubstitution in niedriger Dosis.



Teriparatide-Behandlung

Teriparatide, rekombinantes humanes Parathyroidhormon (PTH) 1–34, fördert die Knochenbildung. Die Fähigkeit des UniQ PINP RIA, Veränderungen des Knochenumbaus nach Teriparatide-Therapie im Rahmen einer Osteoporose-Behandlung zu widerspiegeln, wurde in einer randomisierten Doppelblindstudie an 19 Kliniken untersucht³⁴. An der Studie nahmen Frauen aus der Ambulanz mit gesicherter Osteoporose und mindestens 5jähriger Menopause teil. Einige Studienteilnehmer erhielten einmal täglich 20 µg Teriparatide mit täglicher Kalzium- (1000 mg) und Vitamin D- (400–800 IE) Substitution während der Studie. Daten wurden retrospektiv von 62 Teriparatide-therapierten Patienten im Alter von 64,9 ± 7,8 Jahren (MW ± SD) erhoben, einschließlich den zu den jeweiligen Zeitpunkten ermittelten, komplett verfügbaren BMD (Knochenmineraldichte)- und PINP-Ergebnissen. Bei allen Patienten wurden die Lendenwirbel-BMD-Werte (L1–L4) mit DXA mittels Lunar- oder Hologic-Densitometern vor Behandlung sowie nach 3, 6, 12 und 18 Tagen während der Behandlung gemessen. Intaktes PINP wurde vor und während der Behandlung nach 1, 3, 6 und 12 Monaten mit dem UniQ PINP RIA gemessen.

Der mittlere BMD-Wert war infolge der Teriparatide-Behandlung über den ganzen Zeitraum der Studie zu jedem einzelnen Zeitpunkt im Vergleich zum Grundwert statistisch signifikant (p<0,0001) erhöht. Der Anstieg betrug 0,025 g/cm² nach 3 Monaten, 0,039 g/ cm² nach 6 Monaten, 0,062 g/ cm² nach 12 Monaten und 0,079 g/ cm² nach 18 Monaten.

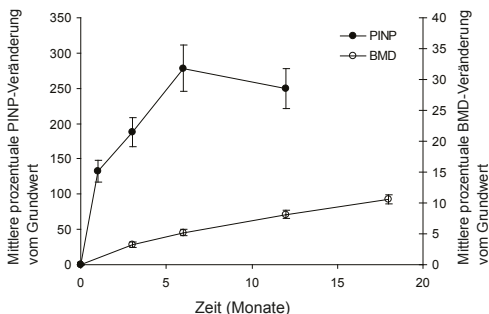
Die mittlere PINP-Konzentration stieg im Vergleich zum Grundwert um 59 µg/l nach 1 Monat, 82 µg/l nach 3 Monaten, 117 µg/l nach 6 Monaten und 103 µg/l nach 12 Monaten. Dieser Anstieg war für alle Zeitpunkte statistisch signifikant (p<0,0001).

Die im Vergleich zum Grundwert prozentuale Veränderung der BMD- und PINP-Werte wurde für jeden Zeitpunkt berechnet. Diese prozentualen Veränderungen werden in Tabelle 5 gezeigt und sind grafisch in Abbildung 5 dargestellt. Die mittleren PINP- und BMD-Werte zeigten einen Anstieg infolge der Teriparatide-Behandlung. PINP erreichte seinen höchsten Wert nach 6 Monaten, gefolgt von einer leichten Abnahme nach 12 Monaten. Der mittlere BMD-Wert nahm infolge der Behandlung zu und erreichte den höchsten Wert gegen Ende der Studie.

Tabelle 5 Prozent-Veränderung (MW+/-SD) der BMD- und PINP-Konzentration bei 62 postmenopausalen Frauen mit Osteoporose während Behandlung mit einmal täglich 20 µg Teriparatide.

Test	Veränderung (MW ± SD)	Veränderung (MW ± SD)	Veränderung (MW ± SD)	Veränderung (MW ± SD)	Veränderung (MW ± SD)
	1 Monat	3 Monate	6 Monate	12 Monate	18 Monate
BMD	k. A.	3.3 ± 3.4 %	5.2 ± 3.8 %	8.1 ± 5.1 %	10.6 ± 5.6 %
PINP	132.6 ± 118.2 %	187.8 ± 164.2 %	278.5 ± 257.1 %	249.5 ± 221.7 %	k. A.

Abb. 5 Prozent-Veränderung (MW $\pm$ SD) der BMD- und PINP-Konzentration bei 62 postmenopausalen Frauen mit Osteoporose während Behandlung mit einmal täglich 20 μ g Teriparatide.



Die Veränderungen der BMD- und intaktem PINP-Werte widerspiegeln die anabole Wirkung der Teriparatide-Behandlung auf den Knochenumbau. Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen und waren vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls einen signifikanten PINP-Anstieg während Teriparatide-Behandlung aufzeigten^{17–20}. Basierend zum Teil auf die gleichen klinischen Daten wie in der oben erwähnten Studie³⁴, wurde ein Algorithmus für den Einsatz von PINP bei der Überwachung von Patienten während Teriparatide-Behandlung entwickelt. Er unterstreicht den klinischen Nutzen von PINP-Bestimmungen bei der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose²¹.

12. TESTSPEZIFIKATION

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse wurden intern bei Aidian ermittelt und representieren die typische Spezifikation des Tests.

Linearität

Proben wurden mit dem Nullkalibrator des UniQ PINP RIAs verdünnt und anschließend mit diesem RIA gemessen. Zur Berechnung der % Wiederfindung wurde die gemessene Konzentration mit dem erwarteten Wert geteilt und mit 100 multipliziert.

Tabelle 6 Linearität des PINP-Assays

Probe	Verdünnung	Erwarteter Wert (µg/l)	Gemessener Mittelwert (µg/l, n=4)	Berechneter Wert für unverdünnte Probe (µg/l)	Wiederfindung (%)
1	Unverdünnt	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			MW SD CV %	189.3 12 6.3	
2	Unverdünnt	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			MW SD CV %	79.9 2.4 3	

Präzision

Die Präzision des Test in der Serie und von Tag zu Tag wurde anhand von gepoolten Seren und Kontrollproben mit unterschiedlichen PINP-Konzentrationen ermittelt.

Tabelle 7 Intra-Assay- / Inter-Assay-Präzision

Präzision in der Serie aus 18 oder 20 Replikaten			Präzision von Tag zu Tag aus 10 Doppelbestimmungen		
Probe	MW (µg/l)	VK (%)	Probe	MW (µg/l)	VK (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Wiederfindung

Zur Untersuchung der Wiederfindung wurden bekannte Mengen gereinigtes PINP-Antigen einer Probe mit einem endogenen PINP-Gehalt von 19,1 µg/l hinzugefügt. Die Probe wurde in Doppelbestimmung mit dem UniQ PINP RIA gemessen und die % Wiederfindung berechnet. Die % Wiederfindung entspricht dem Konzentrationsanstieg geteilt durch die Konzentration der hinzugefügten Substanz und multipliziert mit 100.

Tabelle 8 Wiederfindung von PINP Test

Hinzugefügt (µg/l)	Gemessen (µg/l)	Anstieg (µg/l)	Wiederfindung (%)
–	19.1	–	–
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Spezifität

Der UniQ PINP RIA ist hochspezifisch für intakte trimäre Formen des N-terminalen Propeptids des Typ I Prokollagens. Die niedermolekularen monomeren Abbauprodukte des PINP-Propeptids (Col1) reagieren mit niedriger Empfindlichkeit (Kreuzreaktivität 2,7 %). Der UniQ PINP RIA zeigt keine Kreuzreaktivität mit dem N-terminalen Propeptid des Typ III Prokollagens (PIIINP).

Interferenz

Serum-Bilirubin < 400 µmol/l (< 23 mg/dl), Serum Hämoglobin bis 5 g/l (500 mg/dl) und Triglyzeride bis 30 g/l (3000 mg/dl) stören den Test nicht.

Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze des UniQ PINP RIAs wurden 20 Replikate des Nullkalibrators und 4 Replikate der Standardkurve dreimal gemessen. Die geringste nachweisbare PINP-Konzentration, definiert als die zweifache Standardabweichung des Nullwerts, war < 2 µg/l.

Messbereich

Der Messbereich des UniQ PINP RIAs ist 5–250 µg/l.

13. NACHWEISBARKEIT

Die Messwerte (Analyt), der im UniQ PINP RIA eingesetzten Kalibratoren, beziehen sich auf die Arbeitskalibratoren des Herstellers. Diese wurden aus hoch gereinigtem PINP hergestellt und dessen Wert mittels Analyse ihrer Aminosäurezusammensetzung bestimmt.

14. ENTSORGUNG

- Inhalt entsprechend nationalem und lokalem Recht zuführen.
- Alle Patientenproben und Kontrollen sollten als potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Radioaktive Abfälle müssen in Übereinstimmung mit den geltenden Gesetzen entsorgt werden.
- Materialien der Komponenten:
 - Papier: Gebrauchsanweisung
 - Karton: Kit-Box
 - Kunststoff: Trennreagenz-Fläschchen, Fläschchenstopfen
 - Gummi: Stopfen
 - Glas: Tracer, Antiserum, Kalibrator und Kontrollenfläschchen
 - Schaumstoff
- Wird der Test in Übereinstimmung mit der Good Laboratory Practice, unter guten Hygienebedingungen und nach den Anweisungen dieser Bedienungsanleitung verwendet, stellen die Reagenzien keine Gefahr für die Gesundheit dar.

UniQ® PINP RIA

Dosage Radio-immunologique du propeptide N-terminal du procollagène de type I

1. BUT DU DOSAGE

La méthode UniQ PINP RIA est un dosage radio-immunologique destiné à la mesure quantitative *in vitro* du propeptide aminoterminal intact du procollagène de type I, un indicateur de l'activité ostéoblaste, dans le sérum humain. Ce test est destiné à constituer un outil dans la gestion de l'ostéoporose post-ménopausique. **Pour diagnostic *in vitro*.**

2. RESUME ET EXPLICATION

Le collagène de type I est synthétisé par les fibroblastes et les ostéoblastes et est le type de collagène que l'on trouve en plus grande quantité dans le corps. C'est aussi le seul type de collagène présent dans l'os, où il constitue plus de 90 % de la matrice organique. Comme l'os est l'organe du corps qui contient la plus grande quantité de collagène et qu'il est métaboliquement actif tout au long de la vie, la majorité du collagène de type I synthétisé provient des ostéoblastes osseux.

Le collagène osseux est dérivé d'une protéine plus grande, le procollagène de type I, qui consiste en trois chaînes d'acides aminés qui sont entrelacés pour former une barre en triple hélice. Le procollagène de type I possède des extensions propeptidiques aux deux extrémités de la molécule. Ces propeptides sont libérés par des protéinases spécifiques avant que les molécules du collagène ainsi formées ne s'assemblent en fibres de collagène. On peut trouver ces deux propeptides dans la circulation, où leur concentration permet d'évaluer la synthèse du collagène de type I. L'essai UniQ PINP RIA mesure la concentration sérique du propeptide aminoterminal du procollagène de type I (PINP)¹. Puisque la concentration de cette extension propeptide est directement proportionnelle à la quantité du collagène neuf formé dans l'os, elle peut servir à déterminer la formation osseuse.

Pendant la formation de l'os, la matrice osseuse est formée avant la minéralisation ; ainsi le PINP est un des premiers marqueurs de la formation osseuse. La phosphatase alcaline osseuse, une enzyme de la membrane cellulaire présente dans les ostéoblastes et les préostéoblastes, est également un des premiers marqueurs de l'activité ostéoblaste.² L'ostéocalcine est un marqueur de l'étape ultérieure de la différenciation ostéoblaste qui a lieu pendant la phase de la minéralisation osseuse.³

Le tissu osseux est métaboliquement très actif et subit un remodelage constant tout au long de la vie. Le remodelage osseux est une conséquence de deux procédés compensatoires : la formation et la résorption osseuse. Sous les conditions normales, ces deux procédés sont étroitement liés. Les maladies osseuses métaboliques sont caractérisées par un déséquilibre du remodelage et entraînent souvent un découplage de la formation et la résorption osseuse.⁴ Un indicateur du renouvellement du collagène de type I, comme le PINP, est particulièrement utile pour étudier le remodelage du squelette dans les conditions normales et anormales. Le dosage UniQ du PINP est un outil sensible qui permet de détecter un renouvellement osseux élevé chez la femme en période post-ménopausique⁵⁻⁹ et se révèle particulièrement utile pour suivre les effets d'un traitement contre la résorption sur le métabolisme des os.¹⁰⁻²¹ La détermination du PINP a été également utilisée pour détecter une augmentation du taux de renouvellement de collagène de type I lors de la pathogénèse de plusieurs types de maladies, par exemple la maladie de Paget.²²⁻²⁴

3. PRINCIPLE DU DOSAGE

La méthode UniQ PINP RIA utilise une technique radio-immunologique par compétition. Une quantité connue de PINP marqué et une quantité inconnue de PINP non marqué de l'échantillon entrent en compétition pour un nombre limité de sites anticorps de liaison (anti-PINP polyclonal de lapin). Un deuxième anticorps, dirigé contre IgG de lapin et enrobé de particules de kaolin, sert à séparer le PINP lié à l'anticorps du PINP libre. La radioactivité de l'antigène traceur lié est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. La quantité de PINP marqué dans le tube est inversement proportionnelle à la quantité de PINP de l'échantillon. Les concentrations des échantillons inconnus sont obtenues à partir de la courbe d'étalonnage, établie sur la base de dosages concurrents des standards UniQ PINP RIA contenant de 0 à 250 µg/l de PINP.

4. REACTIFS

UniQ® PINP RIA, Cat. No. 67034

Composant Nom et origine	Symbol	Σ 100	Stabilité à 2...8°C	
			Intact	Ouvert
Traceur	Ag ¹²⁵I	22 ml Radioactivité < 200 kBq	Jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette	6 semaines
Antisérum ORIG RAB	Ab	22 ml	Jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette	6 semaines
Etalons	CAL xxµg/l	7 x 0.5 ml	Jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette	6 semaines
Contrôle ORIG HUM	CONTROL #	2 x 1.0 ml	Jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette	6 semaines après reconstitution
Réactif de séparation du Procollagène	REAG SEPAR	60 ml	Jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette	6 semaines
Mode d'emploi				

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme conservateur, voir le chapitre 5 «Mises en garde et précautions».

Reagent preparation

Les contrôles sont lyophilisée. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
Laisser revenir les contrôles à la température ambiante (18...5°C) avant ouverture. Reconstituer les contrôles en ajoutant 1,0 ml d'eau distillée ou désionisée dans chaque flacon. Fermer et bien mélanger en remuant doucement pour éviter la formation de mousse. Laisser reposer 30 minutes avant utilisation.

Détérioration du réactif

Un changement dans l'aspect physique des réactifs ou dans la courbe d'étalonnage, ou des valeurs des contrôles en dehors de la gamme signalée par le fabricant peuvent indiquer une instabilité des réactifs. Ne pas utiliser si vous soupçonnez une dégradation des réactifs.

5. MISE EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Informations concernant la santé et la sécurité

- Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- Ne pas pipeter à la bouche.
- Tous les échantillons patient et les contrôles doivent être manipulés comme des matériaux potentiellement infectieux.
- Les contrôles contiennent des échantillons d'origine humaine, qui ont été testés et s'avèrent négatifs aux anti-corps anti-virus d'immunodéficience humaine (HIV 1 et 2), au virus de l'hépatite C (VHC) et aux antigènes de surface de l'hépatite B (HBsAg). Par précaution, manipuler les contrôles comme un agent potentiellement infectieux.
- Les réactifs lyophilisés contiennent < 1 % d'azide de sodium (Aquatic Chronic 3). Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme (H412). Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique (EUH032). Éviter le rejet dans l'environnement (P273). Éliminer le contenu conformément aux réglementations nationales et locales en vigueur (P501). L'azide de sodium peut réagir avec le plomb des canalisations pour former des composés explosifs. La formation de composés explosifs peut être évitée en rinçant abondamment avec de l'eau lors de la mise au rebut des réactifs.
- Les réactifs reconstitués et les réactifs liquides contiennent < 0,1% d'azide de sodium, concentration à laquelle il n'est pas nocif.
- Le kit contient de l'iode ¹²⁵I (durée de demi-vie T_{1/2} de 60 jours), émettant des rayons gamma à hauteur de 35,5 keV et des rayons X entre 27 et 32 keV. Le matériau radioactif présent dans ce kit ne peut être réceptionné, acquis, détenu et utilisé que par des médecins, des laboratoires cliniques, des établissements de recherche ou des hôpitaux. Il n'est destiné qu'aux tests cliniques ou de laboratoire *in vitro* n'impliquant aucune administration interne ou externe du matériau ou des radiations émises à des êtres humains ou à des animaux. Tous les matériaux radioactifs doivent être conservés et manipulés uniquement dans les zones conçues à cet effet. L'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis aux lois en vigueur dans le pays de l'utilisateur.
- Éviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et décontaminer, en suivant les directives de votre institution pour les déversements accidentels.
- Tout déversement de matériaux radioactifs doit être immédiatement nettoyé à l'aide d'un détergent et les matériaux de nettoyage contaminés doivent être transférés dans le récipient à déchets radioactifs ou manipulés conformément aux recommandations édictées par le bureau de sûreté nucléaire.
- Les déchets radioactifs doivent être mis au rebut conformément aux lois en vigueur. Se reporter aux réglementations et procédures relatives aux radiations et applicables à votre établissement pour les opérations de manipulation, de stockage et de mise au rebut des matériaux radioactifs.

Précautions pour l'analyse

- Ne pas utiliser le produit au-delà de sa date de péremption figurant sur l'emballage.
- Ne pas dépasser la période de stabilité des réactifs ouverts.
- Ne pas utiliser des composants issus de lots ou de tests différents.

6. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ECHANTILLONS

Aucune préparation particulière du patient n'est nécessaire avant la collecte de l'échantillon. Il faut utiliser le sérum d'un échantillon sanguin veineux prélevé selon les techniques médicales acceptables et suivant les précautions habituelles en cas de ponction veineuse. Ce dosage ne doit pas être effectué sur les échantillons plasmatiques. Des sérums très lipémiques, hémolysés ou microbiologiquement contaminés ne doivent pas être utilisés.

Manipulation et conservation des échantillons

Après la collecte des échantillons, laisser coaguler le sang et séparer le sérum par centrifugation. Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 5 jours à 2...8°C. Pour de plus longues périodes, congeler à une température inférieure ou égale à -20°C. Eviter les congélations et décongélations répétées. Des échantillons possédant des concentrations élevées du PINP peuvent être dilués en utilisant une solution saline 0,9%.

7. REALISATION DU DOSAGE

Voir le chapitre 4 «Reactifs», pour la liste des réactifs.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes (pour livrer de façon fiable 50 µl, 200 µl, 500 µl et 1000 µl)
- Tubes de dosage (En polystyrène, p. Ex 12 x 75mm)
- Papier absorbant
- Parafilm
- Mélangeur Vortex
- Bain marie (à 37±1°C),
- Portoir de decantation
- Centrifugeuse (Pour 2000 g min., De préférence réfrigérée)
- Compteur gamma
- Eau distillée ou desionisee

Appareils

Tous les compteurs gamma capables de mesurer la radioactivité de l'iode¹²⁵ peuvent être utilisés. L'efficacité de comptage de l'appareil doit être vérifiée régulièrement, ainsi que le bruit de fond. Il est conseillé d'étalonner l'appareil systématiquement. Consulter le manuel d'utilisation du fabricant pour l'installation, l'utilisation, l'entretien et l'étalonnage.

Détails de la technique

1	Laisser revenir tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18...25°C) au moins 30 minutes avant utilisation. Mélanger les réactifs en les remuant doucement avant l'utilisation.
2	Marquer en double les tubes en polystyrène revêtus pour les LNS (liaisons non-spécifiques), les étalons, les contrôles, les échantillons des patients et l'activité totale.
3	Introduire 50 µl de chaque étalon, contrôle et échantillon de patients dans les tubes appropriés. N'importe quel échantillon de patient ou l'étalon 0 µg peut être mis dans les tubes LNS.
4	Ajouter 200 µl de traceur (rouge) dans tous les tubes.
5	Ajouter 200 µl d'antisérum (bleu) dans tous les tubes sauf tubes LNS et pour l'activité totale. Ajouter 200 µl d'eau distillée ou désionisée dans les tubes LNS.

6	Agiter tous les tubes avec le vortex, couvrir les tubes avec du parafilm et incuber pendant 2 heures à 37±1°C au bain-marie.
7	Mélanger en remuant doucement le réactif de séparation procollagène et en ajouter 500 µl dans tous les tubes, sauf les tubes pour l'activité totale.
8	Agiter tous les tubes au vortex et incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
9	Centrifuger tous les tubes sauf ceux pour l'activité totale pendant 15 minutes à 2000g minimum et à une température comprise entre 4 et 20°C (4°C est recommandé).
10	Décanner et taper le bord de chaque tube, sauf les tubes de l'activité totale, sur du papier absorbant et laisser égoutter quelques secondes pour éliminer tout liquide restant. Faire attention à ne décanter aucun précipité. Ne pas retourner à nouveau les tubes une fois qu'ils ont été remis à l'endroit. Faire attention à bien décanter et égoutter les tubes au risque de constater une mauvaise réplication et des valeurs erronées.
11	Compter chaque tube avec un compteur Gamma pendant au moins 1 minute par tube.
12	Calculer les résultats selon la partie "Calcul des résultats" du présent document.

Réalisation du dosage - résumé

(tous les volumes sont donnés en µl)

	Total	LNS	Etalon	Contrôle et échantillon
Ajouter échantillon		50	50	50
Ajouter traceur (rouge)	200	200	200	200
Ajouter antisérum (bleu)			200	200
Ajouter eau distillée / désionisée		200		
Mélanger		x	x	x
Incuber 2h à 37°C		x	x	x
Ajouter réactif de séparation		500	500	500
Mélanger		x	x	x
Incuber 30 min à 18–25 °C		x	x	x
Centrifuger 15 min à 2000g		x	x	x
Décantation		x	x	x
Comptage pendant 1 min	x	x	x	x

8. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est recommandé que tous les laboratoires cliniques adopte un programme de contrôle de qualité interne. Ainsi le dosage de sérums de contrôle dans les parties inférieures et supérieures de l'intervalle de référence est conseillé pour contrôler le fonctionnement du dosage. La trousse UniQ PINP RIA fournit deux contrôles: PINP Control 1 & 2. Les gammes de référence des contrôles sont indiquées sur une feuille à part, fournie à l'intérieur du kit. Il est également recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres intervalles acceptables pour les contrôles utilisés dans le laboratoire. La valeur moyenne du contrôle devrait se situer dans l'intervalle fixé par le fabricant. Il est conseillé d'utiliser au moins 2 lots de trousse différents pour déterminer la valeur du contrôle. Une fois que les gammes de contrôle seront établies, les contrôles devraient être dosés en double avec chaque série.

9. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Pour le calcul par ordinateur, il est recommandé d'utiliser une fonction spline. Les résultats peuvent aussi être représentés manuellement sur du papier semi-logarithmique.

- **Calculer** la moyenne des coups pour tous les étalons, échantillons et contrôles et liaisons non-spécifiques (LNS).
- **Calculer** le pourcentage B/B_0 à l'aide de la formule suivante:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Mesure radioactive du calibrateur ou de l'échantillon} - \text{NSB}}{\text{Mesure radioactive du calibrateur 0} - \text{NSB}} \times 100$$

ou B correspond à la réactivité liée d'un échantillon ou étalon, B_0 correspond à la réactivité liée de l'étalon 0 et LNS signifie la réactivité des liaisons non-spécifiques.

- **Tracer** la courbe d'étalonnage sur du papier semi-logarithmique avec le pourcentage B/B_0 en ordonnée (axe-y) et les concentrations en PINP ($\mu\text{g/l}$) des étalons en abscisse (axe-x).
- **Déterminer** les concentrations en PINP des échantillons inconnus à partir de la courbe d'étalonnage.
- **Tout échantillon affiché au-dessous de l'étalon minimum doit être constaté comme tant.**
- **Tout échantillon constaté au-dessus de l'étalon maximum doit être dilué et repassé au dosage.** Après dilution, les valeurs doivent être corrigées selon le facteur de dilution.

Fig. 1

Courbe d'étalonnage type.

Cette courbe est à titre d'exemple.

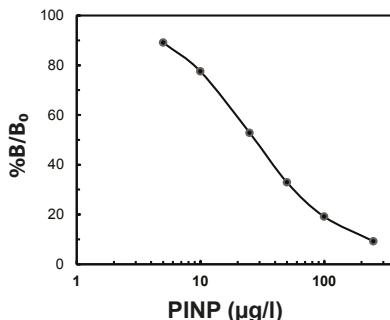


Tableau 1

Calcul des résultats avec des données type.

Ces données ne doivent être utilisées pour un calcul de résultats d'échantillon.

Tube	Moyenne cpm	LNS cpm	$\%B/B_0$	PINP ($\mu\text{g/l}$)
Total	50970			
LNS	845			
Etal. 0	28330	27485		
Etal. 5	25343	24498	89.1	
Etal. 10	22134	21289	77.5	
Etal. 25	15344	14499	52.8	
Etal. 50	9897	9052	32.9	
Etal.100	6095	5250	19.1	
Etal. 250	3379	2534	9.2	
Inconnu 1	10725	9880	35.9	44.6
Inconnu 2	4572	3727	13.6	157

10. LIMITES DE LA METHODE

Les résultats de ce dosage devraient être complétés par d'autres données cliniques pertinentes afin de prendre des décisions diagnostiques et thérapeutiques. Par conséquent, le dosage UniQ PINP n'est pas conseillé comme moyen de dépistage pour détecter la présence d'ostéoporose chez la population en général.

En cas de prise de plusieurs échantillons, la collecte devrait être effectuée à la même heure de la journée. La concentration du PINP varie pendant la journée, et elle est plus élevée la nuit.

Le collagène de type I est aussi synthétisé par des fibroblastes et se trouve également dans le tissu conjonctif avec d'autres types de collagène. Cependant, comme l'os est l'organe du corps qui contient la plus grande quantité de collagène et qu'il est métaboliquement actif tout au long de la vie, la majorité de PINP circulant est d'origine ostéoblaste.²⁵ PINP est métabolisé dans le foie.²⁶ Les maladies hépatiques peuvent influencer sur la clearance de la circulation et entraîner des niveaux élevés de PINP sérique.²⁷

Comme pour la plupart des réactifs utilisant un anticorps secondaire, des échantillons contenant un anticorps qui réagit contre IgG de lapin / de chèvre peuvent fournir des résultats erronés.

11. VALEURS DE REFERENCE

En raison des différences ethniques, d'alimentation et d'âge, les limites de référence données peuvent ne pas être applicables à toutes les populations. Par conséquent, chaque laboratoire devrait établir ses propres limites de références représentatives.

La concentration de PINP a été mesurée, avec la trousse UniQ PINP RIA chez des adultes finlandais blancs, apparemment en bonne santé (19–65 ans). La méthode non-paramétrique recommandée par l'IFCC a été utilisée pour le calcul des limites inférieures et supérieures des intervalles de référence.²⁸

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence pour sa population locale.

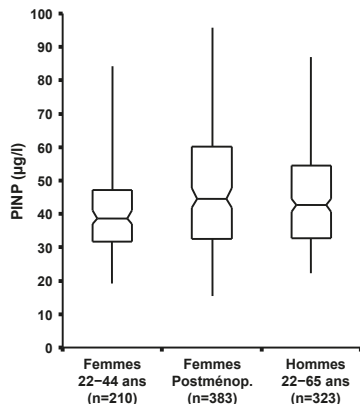
Tableau 2 Limites de référence pour le PINP sérique

	Femme	Femme Post-ménopause*	Homme
Age	25–44	52–62	22–65
Nombre de sujets	210	383	323
Moyenne	42 µg/l	48 µg/l	45 µg/l
Médiane	39 µg/l	45 µg/l	43 µg/l
Intervalle de référence**	19–83 µg/l	16–96 µg/l	22–87 µg/l
0,95-Intervalles de confiance			
pour la limite de référence inférieure	14–23 µg/l	15–19 µg/l	20–25 µg/l
pour la limite de référence supérieure	71–96 µg/l	87–103 µg/l	77–94 µg/l

* Min. 3 ans post-ménopause

**Intervalle de référence = quantiles 0,025 & 0,975

Fig. 2 Les concentrations du PINP chez les adultes apparemment en bonne santé sont représentées graphiquement. La ligne horizontale à l'intérieur de chaque carré représente la valeur médiane, tandis que les limites supérieures et inférieures des carrés représentent les intervalles interquartiles (CAD les valeurs qui sont 25% supérieure ou inférieure à la valeur médiane). Les extrémités des lignes verticales représentent les intervalles de références (quantiles 0,025 & 0,975).



Les résultats ainsi présentés démontrent que les concentrations du PINP chez une population de femmes post-ménopausiques sont élevées par rapport aux concentrations de femmes âgées de 25 à 44 ans ($p = 0,0005$, Mann Whitney). Cette augmentation du PINP reflète l'augmentation du remodelage osseux dû à une déficience d'œstrogène chez les sujets post-ménopausiques par rapport à une population plus jeune. Néanmoins, il faut constater un certain chevauchement des concentrations du PINP entre ces deux populations.

ETUDES CLINIQUES

Traitement à la bisphosphonate

L'utilité d'UniQ PINP RIA pour suivre les changements du remodelage osseux pendant un traitement à la bisphosphonate (10 mg d'alendronate par jour) a été évaluée lors d'une étude prospective comparative avec placebo, multi-site et à double-insu, sur une population de femmes américaines post-ménopausiques depuis au moins 5 ans, et atteintes d'ostéoporose.²⁹ 124 patients étaient divisés en deux groupes de façon aléatoire: 62 recevaient le traitement (TRM) et 62 recevaient le placebo (CTR). Tous les sujets ont reçu 500 mg/j supplément de calcium. Les patients ont été analysés au départ, puis après^{3,6} et 12 mois de traitement. La densité minérale osseuse (DMO) a été mesurée par absorptiométrie double énergie à rayons X (ADEX) et le PINP intacte a été déterminé par UniQ PINP RIA.

Les données sont présentées au Tableau 3 et à la Figure 3. Au départ, la DMO était $0,740 \pm 0,083 \text{ g/cm}^2$ (moyenne $\pm$ SD) dans le groupe CTR et $0,727 \pm 0,104 \text{ g/cm}^2$ dans le groupe TRM. Dans le groupe TRM la DMO moyenne s'est augmentée de 6,0% 12 mois après la ligne du départ. Le changement a été significatif pour tous les points de mesure par rapport à la ligne de départ ($p < 0,0001$). L'augmentation du groupe CTR était moins importante et temporaire: les valeurs sont revenues à celles du départ après 12 mois.

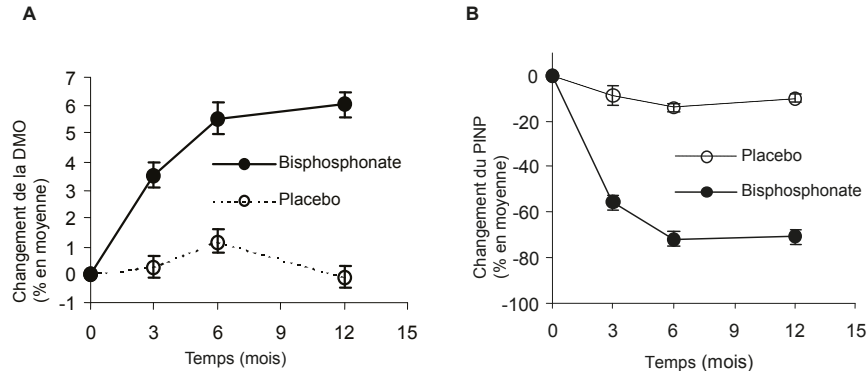
Au départ, la concentration du PINP a été $62,5 \pm 18,5 \text{ µg/l}$ dans le groupe CTR et $61,1 \pm 30,1 \text{ µg/l}$ dans le groupe TRM. La concentration moyenne du PINP dans le groupe TRM a diminué de 70,8% après 12 mois de traitement. La diminution a été significative pour chacun des trois points mesurés après la ligne de départ ($p < 0,0001$). La diminution du groupe CTR, qui recevait aussi le supplément en calcium, a été moins importante: 9,8% après 12 mois.

Les changements de la DMO et du PINP constatés pendant un traitement à la bisphosphonate reflètent l'effet du traitement sur le remodelage osseux. Les résultats étaient attendus et similaires aux études précédentes qui constataient une diminution importante des niveaux du PINP pendant un traitement à la bisphosphonate.^{11, 30-31}

Tableau 3 Réaction d'un patient recevant un traitement à la bisphosphonate ou un placebo: changement de la DMO et du PINP (% en moyenne depuis la ligne du départ)

Test	Groupe	Pourcentage de changement en moyenne (SD) depuis la valeur du départ		
		3 mois	6 mois	12 mois
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	-0.1 (3.2)
	Bisphosphonate	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	-8.6 (25.9)	-14.0 (25.5)	-9.8 (27.4)
	Bisphosphonate	-55.4 (34.0)	-71.6 (15.6)	-70.8 (15.5)

Fig. 3 La réaction des patients recevant un traitement à la bisphosphonate (●) ou un placebo (○) présentée comme changement en pourcentage moyen (barres ± SE) de la concentration de la DMO (A) et du PINP (B).



Afin de démontrer une utilité clinique, la variation en pourcentage entre deux mesures doit excéder à la fois la variabilité analytique (CVa) et la variabilité intra-individuelle (CVi). Ce seuil est considéré comme la variation minimum en pourcentage et peut être calculée comme suit:

$$\text{variation minimum en pourcentage} = \sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV_a^2 + CV_i^2)}$$

Plusieurs valeurs de PINP ont été publiées dans la littérature, par exemple Hannon et ses collègues¹² ont constaté une variation minimum en pourcentage de 21% pour le PINP.

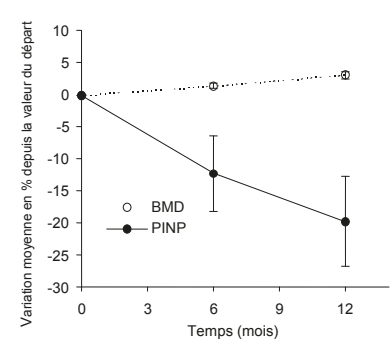
Traitement Hormonal Substitutif

La capacité d'UniQ PINP RIA de refléter les changements du remodelage osseux pendant un traitement hormonal substitutif (THS) chez la femme post-ménopausique a été analysée lors d'une étude de posologie à double insu et à répartition aléatoire.³²⁻³³ Les sujets de l'étude étaient des Finlandaises apparemment en bonne santé avec au moins 3 ans depuis la ménopause. Les données ont été rassemblées à partir de 44 sujets recevant la dose la plus faible du traitement: 1 mg d'oestradiole valérate oral et 2,5 mg de medroxyprogestérone acétate oral par jour. Les patients ont été analysés au départ de l'étude et après 6 et 12 mois de traitement. La densité minérale osseuse (DMO) a été mesurée par absorptiométrie double énergie à rayons X (ADEX) et le PINP intacte a été déterminé par UniQ PINP RIA. Les données sont présentées au Tableau 4 et à la Figure 4. Au départ, la DMO était de $1,083 \pm 0,182$ g/cm² (moyenne $\pm$ SD) et la concentration du PINP était de $42,2 \pm 15,3$ µg/l. Après 6 mois la DMO s'est augmentée de 1,4% en moyenne et à 12 mois elle était 3,1% au-dessus de la valeur du départ. Après 6 mois les niveaux du PINP ont baissé de 12,3% par rapport à la valeur du départ et de 19,8% après 12 mois. Les changements de la DMO et du PINP ont été significatifs ($p < 0,002$) aux deux points de mesure comparés aux valeurs du départ. Les changements de la DMO et du PINP constatés pendant un traitement hormonal substitutif reflètent l'effet du traitement, même à doses faibles, sur le remodelage osseux. Les résultats étaient attendus et similaires aux études précédentes qui constataient une diminution importante des niveaux du PINP pendant un traitement hormonal substitutif.^{12-13,15}

Tableau 4 Réaction des patients post-ménopausiques recevant un traitement hormonal substitutif combiné à basse dose: variation moyenne en pourcentage de la DMO et du PINP.

Test	Variation moyenne en pourcentage (SD) depuis la valeur du départ	
	6 mois	12 mois
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Fig. 4 Réaction des patients post-ménopausiques recevant un traitement hormonal substitutif combiné à basse dose: variation moyenne en pourcentage (barres $\pm$ SE) de la DMO (○) et de la concentration du PINP (●)



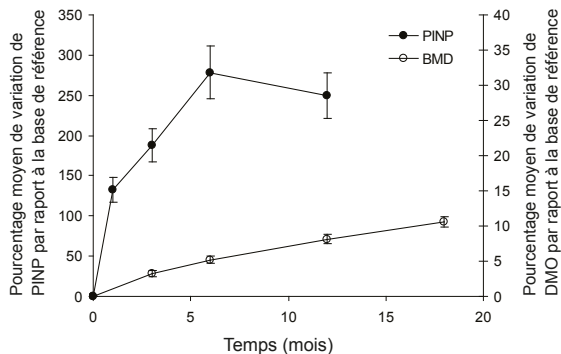
Traitement par téraparatide

Le téraparatide est une parathormone humaine [PTH] 1–34 issue de l'ADN recombiné qui stimule la formation osseuse. La capacité du UniQ PINP RIA (dosage radio-immunologique du propeptide N-terminal du procollagène de type I) à refléter les changements du remodelage osseux lors du traitement de l'ostéoporose par téraparatide, a fait l'objet de différentes études (19 sites cliniques en protocole randomisé en double aveugle).³⁴ Les sujets de l'étude étaient des femmes mobiles en période post-ménopausique (au moins 5 ans après la ménopause) présentant une ostéoporose définie. Des doses quotidiennes uniques de 20 µg de téraparatide associées à une supplémentation quotidienne en calcium (1 000 mg) et en vitamine D (de 400 à 800 UI), ont été administrées à un sous-groupe de sujets tout au long de l'étude. Les résultats de densité minérale osseuse (DMO) et de PINP de 62 patientes âgées de 64,9 ans (avec un écart-type moyen de ± 7,8 ans) ayant reçu du téraparatide, ont été recueillis à des temps de prélèvement bien précis. La densité minérale osseuse de la colonne lombaire (L1-L4) a été mesurée chez l'ensemble des patientes par absorptiométrie biénergétique à rayons X (DEXA) au moyen de densitomètres lunaires ou hologiques aux conditions basales et après 3, 6, 12 et 18 mois de traitement par téraparatide. Un PINP intact a également été mesuré aux conditions basales et après 1, 3, 6 et 12 mois de traitement par dosage RIA PINP UniQ. La thérapie par téraparatide a entraîné une augmentation moyenne de la densité minérale osseuse tout au long de la période d'étude. Les augmentations se sont avérées statistiquement significatives à chaque étape d'observation ($p < 0,0001$) par rapport à la valeur initiale. La densité minérale osseuse moyenne a augmenté de 0,025 g/cm² après 3 mois, de 0,039 g/cm² après 6 mois, de 0,061 g/cm² après 12 mois et de 0,079 g/cm² après 18 mois. La concentration moyenne de PINP s'est accrue de 59 µg/l par rapport à la valeur initiale après un mois, de 82 µg/l après 3 mois, de 117 µg/l après 6 mois et de 103 µg/l après 12 mois. L'augmentation de concentration en PINP par rapport à la valeur initiale s'est avérée statistiquement significative à chaque étape d'observation ($p < 0,0001$). La variation, en pourcentage, de la DMO et du PINP par rapport à la valeur initiale a été calculée à chaque étape de l'observation. Le Tableau 5 présente les variations moyennes en pourcentage sous forme graphique à la Figure 5. Les valeurs moyennes de PINP et de DMO ont augmenté en réponse au traitement par téraparatide. Le PINP a culminé au 6e mois suivi d'une légère baisse au 12e mois. La densité minérale osseuse moyenne a augmenté en réponse au traitement et une valeur maximale a été observée à l'issue de la période d'étude.

Tableau 5 Réaction exprimée en pourcentage moyen de variation (± écart-type) de concentration en PINP et DMO chez 62 femmes en période post-ménopausique atteintes d'ostéoporose auxquelles ont été administrées des doses quotidiennes (une fois par jour) de 20 µg de téraparatide.

Test	Variation (± écart-type moyen)	Variation (± écart-type moyen)	Variation (± écart-type moyen)	Variation (± écart-type moyen)	Variation (± écart-type moyen)
	1 mois	3 mois	6 mois	12 mois	18 mois
BMD	Non disponible	3.3 ± 3.4 %	5.2 ± 3.8 %	8.1 ± 5.1 %	10.6 ± 5.6 %
PINP	132.6 ± 118.2 %	187.8 ± 164.2 %	278.5 ± 257.1 %	249.5 ± 221.7 %	Non disponible

Fig. 5 Réaction exprimée en pourcentage moyen de variation ($\pm$ écart-type) de concentration en PINP et DMO chez 62 femmes en période post-ménopausique atteintes d'ostéoporose auxquelles ont été administrées des doses quotidiennes (une fois par jour) de 20 μ g de téraparatide.



Les variations observées dans les niveaux de DMO et de PINP intact reflètent l'effet anabolique de la thérapie par téraparatide sur le remodelage osseux. Ces résultats étaient conformes aux attentes et similaires aux autres rapports, lesquels ont démontré d'importantes augmentations des niveaux de PINP au cours du traitement par téraparatide.¹⁷⁻²⁰ Un algorithme, en partie basé sur le même équipement clinique que l'étude ci-dessus³⁴ a été mis au point en vue d'utiliser le PINP comme élément de contrôle des patients traités par téraparatide. Cet algorithme permet de souligner l'utilité clinique des mesures de PINP dans le suivi de l'ostéoporose post-ménopausique.²¹

12. PERFORMANCES DU DOSAGE

Les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus chez Aidian et représentent les données typiques.

Linéarité

La linéarité du kit UniQ PINP RIA a été étudiée en diluant des échantillons avec l'étalon zéro de la trousse. Le pourcentage de la récupération a été calculé en divisant la concentration constatée par la concentration attendue et en multipliant ensuite par 100.

Tableau 6 Linéarité du dosage PINP

Echantillon	Dilution	Valeurs cibles (µg/l)	Valeurs mesurées, moyenne (µg/l, n=4)	Valeurs calculées, pur (µg/l)	Taux de récupération (%)
1	Pur	—	211.5	—	—
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			Moyenne DS CV %	189.3 12 6.3	
2	Pur	—	80.9	—	—
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			Moyenne DS CV %	79.9 2.4 3	

Précision

La précision intra-essai et inter-essais a été estimée sur les échantillons sériques et les contrôles contenant différentes concentrations de PINP.

Tableau 7 Précision intra-test / inter-test

Précision intra-essai de 18 ou 20 multiplets			Précision inter-essais de 10 déterminations en doublets		
Echantillon	Moyenne (µg/l)	CV (%)	Echantillon	Moyenne (µg/l)	CV (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Récupération

Des quantités connues d'antigène PINP purifié ont été ajoutées à un échantillon de sérum contenant 19,1 µg / l de PINP endogène. L'échantillon a été mesuré en doublet avec la trousse UniQ PINP RIA et le pourcentage de récupération a été calculé. La récupération en % égale l'augmentation de la concentration divisée par la concentration du PINP ajouté (spike) et multiplié par 100.

Table 8 Récupération du test des PINP

Spike (µg/l)	Constaté (µg/l)	Augmentation (µg/l)	Récupération (%)
—	19.1	—	—
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Spécificité

La trousse UniQ PINP RIA est très spécifique aux formes trimériques du propeptide aminoterminal intact du procollagène de type I. Elle est peu sensible aux produits monomériques de dégradation de faible poids moléculaire du propeptide PINP (réactivité croisée seulement de 2,7 %). La trousse UniQ PINP RIA ne présente pas de réactions croisées avec les antigènes des trouses UniQ PIIINP RIA.

Substances interférentes

Une concentration sérique de bilirubine $< 400 \mu\text{mol/l}$ ($< 23 \text{ mg/dl}$) n'interfère pas. Une concentration sérique d'hémoglobine inférieure ou égale à 5 g/l (500 mg/dl) n'interfère pas non plus. Une concentration de triglycérides inférieure ou égale à 30 g/l (3000 mg/dl) n'interfère pas non plus.

Limite de détection

La limite de détection du test UniQ PINP RIA a été calculée en mesurant trois fois 20 multiplats de l'étalon $0 \mu\text{g/l}$ et la courbe d'étalonnage (4 multiplats). La concentration minimum détectable du PINP dans le test a été $< 2 \mu\text{g/l}$, définie comme étant 2 fois l'écart-type de la liaison de l'étalon 0.

Etendue de mesure

L'étendue de mesure de l'UniQ PINP RIA est de 5 à $250 \mu\text{g/l}$.

13. TRACABILITE

Le mesurand (analyte) des étalons du kit UniQ PINP RIA est traçable aux étalons du fabricant qui sont préparés à partir d'un PINP purifié dont la valeur est assignée selon une analyse de la composition d'acides aminés.

14. MISE AU REBUT

- Éliminer le contenu conformément aux réglementations nationales et locales en vigueur (P501).
- Tous les échantillons patient et les contrôles doivent être manipulés comme des matériaux potentiellement infectieux.
- Les déchets radioactifs doivent être mis au rebut conformément aux lois en vigueur. Se reporter aux réglementations et procédures relatives aux radiations et applicables à votre établissement pour les opérations de manipulation, de stockage et de mise au rebut des matériaux radioactifs.
- Matériaux des composants:
 - Papier: manuel d'utilisation
 - Carton: boîte contenant le kit
 - Plastique: Bouteille du réactif de séparation, bouchons des flacons
 - Caoutchouc: bouchons
 - Verre: flacons des traceurs, de l'anti sérum, des calibrateurs et des contrôles
 - Mousse de plastique
- S'ils sont utilisés selon les bonnes pratiques de laboratoire, avec une bonne hygiène du plan de travail et suivant le mode d'emploi, les réactifs ne représentent pas de danger pour la santé.

UniQ® PINP RIA

Intact N-terminal propeptide of type I procollagen, radioimmunoassay

1. TOEPASSING

UniQ PINP RIA is een kwantitatieve radioimmunoassay, ontworpen voor de meting van de concentratie van intact aminoterminaal propeptide, type I procollageen, een indicator voor osteoblastische activiteit in humaan serum. De test is bedoeld om te worden gebruikt als ondersteuning voor bewaking van postmenopausale osteoporose.

Alleen voor *in vitro* diagnostisch gebruik.

2. SAMENVATTING EN UITLEG

Type I collageen, dat wordt gesynthetiseerd door fibroblasten en osteoblasten, is het meest voorkomende collageen-type in het lichaam en het enige type collageen dat wordt aangetroffen in gedemineriseerd bot, en waar het voor meer dan 90 % deel uitmaakt van de organische matrix. Aangezien bot het voornaamste collageen-orgaan is en metabolisch gezien als zeer actief gedurende het leven, komt het voornaamste gesynthetiseerde type I collageen voort vanuit de bot-osteoblasten.

Botcollageen is afgeleid van een groter proteïne – type I-procollageen, dat bestaat uit drie aminozuurketens die met elkaar zijn verweven om een staafvormige drievoudige helix te vormen. Type I procollageen heeft propeptide extensies aan beide zijden van het molecuul, deze worden verwijderd door specifieke proteinases, voordat de collageen moleculen aldus worden geassembleerd tot collageenvezels. Beide propeptiden kunnen in de circulatie worden gevonden, de concentraties hiervan reflecteren de kwantiteit van de synthese van type I collageen. De UniQ PINP RIA bepaling meet de serumconcentratie van het aminoterminaal propeptide van type I procollageen (PINP).¹ Omdat de concentratie van dit extensie-propeptide direct proportioneel is voor de vastgestelde hoeveelheid van nieuw collageen in bot, kan deze worden gebruikt ter beoordeling van botformatie.

Tijdens botformatie wordt de botmatrix geproduceerd voordat mineralisatie plaatsvindt; vandaar dat PINP een vroege marker is voor botformatie. Bot-alkalisch-fosfatase, een celmembraan-enzyme, aanwezig in pre-osteoblasten en osteoblasten, is een andere vroege marker voor osteoblastactiviteit.² Osteocalcin is een late marker van de osteoblast-differentiatie die voortkomt uit de botmineralisatie-fase.³

Botweefsel is opmerkelijk metabolisch actief gedurende het leven en ondergaat een constante verandering. Bot-remodeling wordt verkregen door twee tegengestelde processen: botformatie en botresorptie, onder normale omstandigheden zijn deze stevig aan elkaar gekoppeld. Metabolische botziekten worden gekarakteriseerd door onevenredigheid in botvorming en leidt tot ontkoppeling tussen botvorming en resorptie.⁴ Een indicator voor botvorming, zoals PINP, is zeer nuttig voor het vaststellen van skelet-remodeling tijdens normale en abnormale omstandigheden.

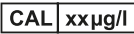
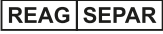
De UniQ PINP-bepaling biedt een gevoelig instrument voor inzicht van verhoogde botaanmaak bij postmenopausale vrouwen⁵⁻⁹ en kan deels ook nuttig zijn voor monitoring van het effect van anti-resorptieve en anabolische therapie op botmetabolisme.¹⁰⁻²¹ De bepaling van PINP-concentraties is ook gebruikt om verhoogde aanmaak van type I collageen te detecteren bij ziekten zoals de botziekte van Paget.²²⁻²⁴

3. TESTPRINCIPES

UniQ PINP RIA-kit is gebaseerd op de competitieve radioimmunoassay techniek. Een bekende hoeveelheid van gelabeld PINP en een onbekende hoeveelheid van niet-gelabeld PINP in het monster concurreren voor een gelimiteerd aantal bindingsplaatsen met hoge affiniteit, van het polyclonale konijn anti-PINP antibody. Een tweede antibody, gericht tegen konijn IgG en gecoat aan kaoline partikels, wordt gebruikt om antibody-gebonden PINP te scheiden van vrij PINP. De radioactiviteit van het gebonden tracer-antigeen wordt gemeten in een gamma-counter. De hoeveelheid van

gelabeld PINP in het monsterbuisje is omgekeerd evenredig met de hoeveelheid PINP in het monster. De concentraties in de onbekende monsters worden verkregen door middel van een kalibratiecurve, deze is gebaseerd op het gelijktijdig testen van de UniQ PINP RIA-kalibratoren die 0 tot 250 µg/L PINP bevatten.

4. REAGENTIA
UniQ® PINP RIA, Cat. No. 67034

Naam component en oorsprong	Symbool	 100	Stabiliteit bij 2...8°C	
			Niet geopend	Geopend
Tracer		22 mL Radioactiviteit < 200 kBq	Tot de exp. datum die staat vermeld op het label	6 weken
Antiserum 		22 mL	Tot de exp. datum die staat vermeld op het label	6 weken
Kalibrator		7 x 0.5 mL	Tot de exp. datum die staat vermeld op het label	6 weken
Control 		2 x 1.0 mL	Tot de exp. datum die staat vermeld op het label	6 weken na het oplossen
Procollageen Scheidingsreagens		60 mL	Tot de exp. datum die staat vermeld op het label	6 weken
Gebruiksaanwijzing				

De reagentia bevatten natriumazide als conserveermiddel. Zie hoofdstuk 5 "Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen".

Vorbereiding reagentia

De controle is gevriesdroogd. Alle andere reagentia zijn klaar voor gebruik. Laat de controleflacon vóór opening eerst op kamertemperatuur komen (18...25°C). Los de controle op door toevoeging van 1.0 mL gedestilleerd- of gedemineraliseerd water aan het flesje. Sluit het flesje af en meng voorzichtig door zwenken of door om te keren. Laat vóór gebruik 30 min. staan.

Bederf van reagentia

Veranderingen in de fysische vorm van de reagentia of de helling van de kalibratiecurve, of van gescoorde waarden van controle-sera buiten de door de fabrikant opgegeven acceptabele range, kunnen een indicatie zijn voor instabiliteit van reagens. Gebruik geen reagentia die mogelijk bedorven kunnen zijn.

5. WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

Gezondheids- en veiligheidsinformatie

- Alleen voor *in vitro* diagnostisch gebruik.
- Pipetteer niet met de mond.
- Alle patiëntenmonsters en controles dienen te worden behandeld als potentieel infectieus materiaal.
- De controles bevatten materiaal van humane oorsprong, deze zijn getest en negatief bevonden voor humane immuun-deficiënte virus antilichamen (HIV 1 en 2), hepatitis C virus (HCV) en hepatitis B oppervlakte-antigeen (HBsAg). Behandel uit voorzorg deze controles alsof het een mogelijk infectieus reagens is.
- Gevriesdroogde reagentia bevatten <1% natriumazide (Aquat. Chron. 3). Schadelijk voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen (H412). Vormt zeer giftig gas in contact met zuren (EUH032). Voorkom lozing in het milieu (P273). Inhoud afvoeren volgens nationale en lokale wetgeving (P501). Azides kunnen ook reageren met loden af- voerpijpen er ontstaan dan explosieve verbindingen. Het concentreren van azide kan worden vermeden door tijdens afvoer van reagentia met grote volumes water te spoelen.
- Opgeloste en vloeibare reagentia bevatten <0,1 % natriumazide, dit is geen schadelijke concentratie.
- De kit bevat 271-tracer (halfwaardetijd t1/2 van 60 dagen), dit isotoop emiteert 35,5 keV gammastralen en 27–32 keV röntgenstralen. Het radio-actieve materiaal in deze kit mag alleen in ontvangst worden genomen, behandeld en gebruikt, door artsen, klinische laboratoria, research-instituten of ziekenhuizen. Alleen voor gebruik van *in vitro* klinische- en laboratorium- diagnostische testen, zonder inwendig of uitwendig gebruik van het materiaal, of daaruit voortkomende straling voor mens en dier. Alle radioactieve materialen dienen alleen te worden opgeslagen en behandeld in speciaal daarvoor aangewezen gebieden. Aankoop, opslag, gebruik of scheiding van radioactieve producten zijn onderworpen aan de geldende wetgeving in het land van de gebruiker.
- Vermijd contact met huid en ogen. Na contact met de huid, was onmiddellijk met veel water en maak de huid schoon volgens de richtlijnen van uw instelling, voor per ongeluk gemorste vloeistoffen.
- Gemors van radioactieve materialen dient onmiddellijk te worden schoongemaakt met een wasmiddel en de gecontamineerde materialen dienen te worden overgebracht naar een container voor radioactief afval, of dienen te worden behandeld volgens de aanbevelingen van de stralingsveiligheids-dienst.
- Zie de regelgeving voor straling en de toepassingsprocedures van uw instelling, mbt behandeling, opslag en afvoer van radioactieve materialen.

Analytische voorzorgsmaatregelen

- Gebruik het product niet na de expiratedatum, die staat aangegeven op de buitenkant van de verpakking.
- Overschrijd de houdbaarheidsperiode niet voor geopende reagentia.
- Meng geen componenten van verschillende lotnummers of van verschillende testen.

6. MONSTERVERZAMELING EN PREPARATIE

Er is geen speciale voorbereiding voor de patient nodig voordat een monster wordt afgenomen.

Er dient serum te worden gebruikt nadat een normaal veneus bloedmonster is verzameld volgens een acceptabele medische techniek die voldoet aan de normale voorzorgsmaatregelen voor venipuncture. De bepaling kan niet worden gebruikt voor plasmamonsters. Gebruik van hoog lipemische, gehemolyseerde of microbiologisch gecontamineerde patiëntenmonsters dienen te worden vermeden.

Monsterbehandeling en opslag

Laat het bloed na verzameling van het monster stollen en scheid het serum door te centrifugeren. Serummonsters kunnen 5 dagen worden bewaard bij 2...8°C. Voor opslag bij langere perioden, bewaar de monsters bij –20°C of kouder. Vermijd herhaaldelijk invriezen en ontdooien.

Monsters met een hoge PINP concentratie kunnen worden verdund met een fysiologische zoutoplossing (0,9 % NaCl) .

7. PROCEDURE

Zie hoofdstuk 4, "Reagentia", voor de lijst met reagentia.

Benodigde materialen maar niet meegeleverd

- Pipetten (voor accurate afgifte van 50 μ L, 200 μ L, 500 μ L en 1000 μ L)
- Testbuizen (polystyreen, b.v. 12 x 75 mm)
- Absorberend papier
- Parafilm
- Vortex mixer
- Waterbad (geschikt voor 37 $\pm$ 1°C)
- Decanteerrack
- Centrifuge (geschikt voor ten minste 2000 g, bij voorkeur gekoeld)
- Gamma-counter
- Gedestilleerd- of demiwater

Instrumenten

Iedere gammacounter die ¹²⁵I kan meten, kan worden gebruikt. Het telrendement van het instrument dient regelmatig te worden gecontroleerd, evenals de achtergrondmetingen. Het verdient aanbeveling dat het instrument systematisch wordt gecalibreerd. Voor details van installatie, het gebruik, onderhoud en calibratie, raadpleeg de bedieningshandleiding die door de producent van het instrument wordt meegeleverd.

Details van de procedure

1	Breng vóór gebruik eerst alle reagentia en monsters op kamertemperatuur (18...25°C). Meng alle reagentia door vóór gebruik eerst voorzichtig te mengen.
2	Label de polystyreen testbuizen in duplo voor de specifieke binding (NSB), de kalibratoren, de controle, de patiëntmonsters en de totaal telling
3	Pipetteer 50 μ L kalibrator, controle of patiëntmonster in de betreffende buizen. Voor de NSB kan elk willekeurig monster worden gepipetteerd.
4	Pipetteer 200 μ L van de tracer (rood) in alle buizen.
5	Pipetteer 200 μ L van het antiserum (blauw) in alle buizen, behalve in de NSB- en de totaal tellig-buizen Pipetteer 200 μ L gedestilleerd water in de NSB buizen.
6	Meng alle buizen (behalve de totaal telling-buizen) op een vortexmixer, bedek de buizen met parafilm en incubeer 2 uren bij 37 $\pm$ 1°C.
7	Meng het procollageen scheidingsreagens door de flacon zachtjes om te keren en voeg 500 μ L toe aan alle buizen, behalve aan de totaal telling-buizen.
8	Meng de buizen met een vortexmixer en incubeer 30 minuten bij kamertemperatuur (18...25°C).
9	Centrifugeer alle buizen (behalve de totaal telling-buizen), 15 minuten bij minimaal 2000 g, bij 4...20°C (4°C wordt aanbevolen).
10	Decanteer de supernatanten van alle buizen (behalve de totaal telling-buizen) door deze gelijktijdig om te keren. Dip de buizen voorzichtig op absorberend materiaal en laat ze een paar seconden afdruppen om achterblijvende vloeistof te verwijderen. Let goed op dat er geen precipitaat wordt gedecanteerd. Keer de buizen niet meer om nadat ze eenmaal rechtop zijn gezet. Foutief decanteren en afdippen kunnen resulteren in slechte duplowaarden en foutieve waarden.
11	Tel elke buis met een gammacounter gedurende 1 minuut, of totdat er 10.000 counts per buis zijn verzameld.
12	Bereken de resultaten zoals beschreven in het hoofdstuk 9 "Resultaten interpretatie".

Testprocedure – samenvatting

(Alle volumina zijn weergegeven in µL)

	Totaal	NSB	Kalibrator	Controle & onbekende
Pipetteer monster		50	50	50
Pipetteer tracer (rood)	200	200	200	200
Pipetteer antiserum (blauw)			200	200
Pipetteer gedest. / demi water		200		
Meng		x	x	x
Incubeer 2 uren bij 37°C		x	x	x
Pipetteer scheidingsreagens		500	500	500
Meng		x	x	x
Incubeer 30 min bij 18...25°C		x	x	x
Centrifugeer 15 min bij 2000 g (4...20°C)		x	x	x
Decanteer		x	x	x
Tel 1 min. of 10.000 counts	x	x	x	x

8. KWALITEITSCONTROLE

Voor alle klinische laboratoria wordt een intern kwaliteitscontrole-programma aanbevolen. Daarom wordt gesuggereerd dat er controlesera worden ge-analyseerd in zowel het lage als ook in het hoge gedeelte van de kalibratiecurve, dit om goede prestaties te verkrijgen van de procedure die wordt gevolgd. Met de UniQ PINP RIA-kit worden twee controles meegeleverd: PINP RIA Control 1 & 2. De verwachte meetrange van de controles staat vermeld op een separaat blad dat met de kit wordt meegeleverd. Het is aanbevolen dat elk laboratorium zijn eigen acceptabele ranges vaststelt voor de controle die wordt gebruikt. De gemiddelde score van de controle moet binnen de acceptabele range vallen zoals is vastgesteld door Aidian. Verder wordt aanbevolen om tenminste twee separate kitlotnummers te gebruiken voor vaststelling van de controlewaarde. Wanneer de controle-ranges zijn vastgesteld dienen deze in elke run, in duplo te worden gemeten.

9. RESULTATEN INTERPRETATIE

Voor een automatische resultaatverwerking wordt geadviseerd een standaardcurve-fitting te gebruiken met Spline functie. Resultaten kunnen ook handmatig worden verkregen op semi-logaritmisch grafiekpapier.

- **Bereken** de gemiddelde telling voor alle kalibratoren, monsters en controles.
- **Bereken** het %B/B₀ van:

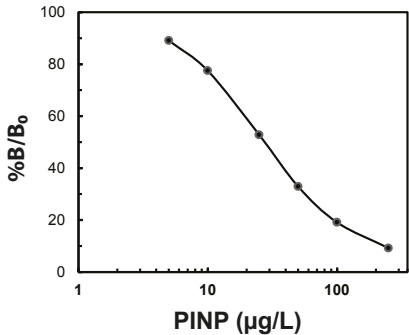
$$\%B/B_0 = \frac{\text{Kalibrator of monstertelling} - \text{NSB}}{\text{Telling kalibrator} - \text{NSB}} \times 100$$

B is de gebonden hoeveelheid radioactiviteit van het monster of de kalibrator, B₀ is de gebonden hoeveelheid radioactiviteit van kalibrator 0, en NSB is de radioactiviteit van de aspecifieke binding.

- **Teken** een kalibratiecurve op semilogaritmisch grafiekpapier met de %B/ B₀ waarden op de ordinaat (Y-as) en de PINP concentraties (µg/L) van de kalibrators op de abscis (X-as).

- **Bepaal** de PINP-concentraties van de onbekenden door aflezing op de kalibratiecurve.
- **Elk monster dat lager wordt afgelezen dan de laagste kalibrator dient als zodanig gerapporteerd te worden.**
- **Elk monster dat hoger wordt afgelezen dan de hoogste kalibrator dient te worden verdund en opnieuw te worden bepaald.** Na verdunning moeten de waarden worden gecorrigeerd met de verdunningsfactor.

Fig. 1 Typische calibratiecurve.
Deze kalibratiecurve is alleen ter illustratie.



Tabel 1 Berekening van de resultaten waarbij de typische data zijn gebruikt.
Deze data zijn alleen ter illustratie en dienen niet te worden gebruikt voor berekening van een monsterresultaat.

Buis	Gem. cpm	cpm- NSB	%B/B ₀	PINP (µg/L)
Totaal	50970			
NSB	845			
Kal 0	28330	27485		
Kal 5.0	25343	24498	89.1	
Kal 10	22143	21289	77.5	
Kal 25	15344	14499	52.8	
Kal 50	9897	9052	32.9	
Kal 100	6095	5250	19.1	
Kal 250	3379	2534	9.2	
Onbe- kende 1	10725	9880	35.9	44.6
Onbe- kende 2	4572	3727	13.6	157

10. BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE

Als basis voor diagnostische en therapeutische beslissingen dienen de resultaten te worden gebruikt in overeenstemming met andere klinisch relevante informatie. Daarom wordt de UniQ PINP bepaling niet aanbevolen als screenings-procedure om aanwezigheid van osteoporose te detecteren in algemene populaties. Tijdens evaluatie van opeenvolgende monsters, verzamel deze monsters dan op hetzelfde tijdstip van de dag, dit omdat er een variatie is van hogere PINP waarden tijdens de nacht. Type I collageen wordt ook gesynthetiseerd door fibroblasten en kan dus worden gevonden in los bindweefsel, samen met andere collageentypes. Echter, omdat bot het belangrijkste collageenorgaan is en ook metabolisch actief is tijdens het leven, is het merendeel van het circulerende PINP van osteoblastische oorsprong.²⁵ PINP wordt gemetaboliseerd in de lever.²⁶ Een ernstige leverziekte kan effect hebben op afgifte vanuit de circulatie en resulteren in verhoogde serum PINP-waarden.²⁷ Omdat de meeste assays secundaire antilichodes gebruiken, kunnen monsters die antilichamen bevatten die reageren met konijn/geit IgG (zoals heterofiele antilichamen), foutieve resultaten veroorzaken.

11. VERWACHTE WAARDEN

Vanwege etnische-, dieet- en leeftijdsvariates kunnen de gegeven referentiewaarden niet worden toegepast voor alle populaties. De ranges van de onderstaande gerapporteerde observaties zijn alleen representatief en geven noodzakelijkerwijs niet de ranges die zullen worden waargenomen in een bepaalde klinische setting. PINP-waarden van blijkbaar gezonde blanke Finse volwassenen werden gemeten met de UniQ RIA-kit. De niet-parametrische methode, aanbevolen door de IFCC, werd gebruikt om de referentie-intervallen te berekenen voor zowel de hoge en de lage referentiewaarden.²⁸

Daarom dient elk laboratorium zijn eigen representatieve referentiewaarden vast te stellen voor de lokale populatie.

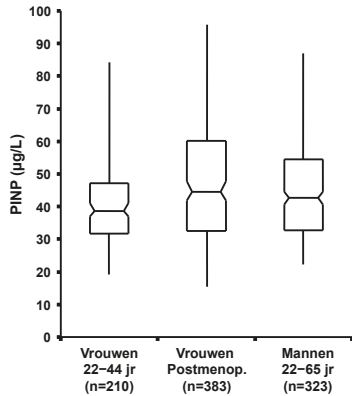
Tabel 2 Serum-PINP verwachte waarden

	Vrouw	Vrouw, Postmenopausaal *	Man
Leeftijd in jaren	25–44	52–62	22–65
Aantal monsters	210	383	323
Gemiddeld	42 µg/L	48 µg/L	45 µg/L
Mediaan	39 µg/L	45 µg/L	43 µg/L
Referentie-interval**	19–83 µg/L	16–96 µg/L	22–87 µg/L
0.95-betrouwbaarheids-interval			
Voor lage referentiewaarden	14–23 µg/L	15–19 µg/L	20–25 µg/L
Voor hoge referentiewaarden	71–96 µg/L	87–103 µg/L	77–94 µg/L

*Min. 3 jaren postmenopausaal

**Referentie-interval = 0.025 & 0.975 percentiel

Fig. 2 Box-Whisker-plots (doosdiagram) van de verdeling van PINP-concentraties in blijkbaar gezonde volwassen personen. De horizontale lijn in elke box representeert de de mediaanwaarde terwijl de lage en hoge waarden in de boxen de interkwartiele ranges indiceren, b.v. waarden 25% boven- en onder de mediaan. De tips van de whiskers laten de limieten van de referentiewaarden zien (0,025 & 0,975 percentielen).



De hierboven gepresenteerde resultaten laten zien dat PINP-concentraties in een populatie van postmenopausale vrouwen zijn verhoogd, vergeleken met concentraties bij vrouwen in de leeftijd van 25 – 44 jaar ($p=0,0005$, Mann Whitney). Deze stijging in PINP-waarde reflecteert de toename in bot-remodeling, geassocieerd met oestrogeen-deficiëntie in een populatie van postmenopausale vrouwen, ten opzichte van de waarden in een jongere populatie. Echter, er is een aanzienlijke overlap in PINP-concentraties binnen de twee populaties.

KLINISCHE STUDIES

Biofosfonaat behandeling

De bruikbaarheid van de UniQ PINP RIA om de veranderingen in bot-remodeling te monitoren tijdens behandeling (10 mg alendronaat/ dag), werd bestudeerd in een multi-site, prospectieve, dubbel-blinde en placebo-gecontroleerde studie bij postmenopausale vrouwen in een US populatie met een gedefinieerde osteoporose, tenminste 5 jaren sinds de menopauze.²⁹ Data werden verkregen uit 124 patiënten, gerandomiseerd in twee groepen: 62 patiënten kregen de behandeling (TRM) en 62 patiënten kregen een placebo (CTR) . Alle studie-participanten kregen per dag 500 mg calci-umsuppletie. Patiënten werden basaal geanalyseerd en 3, 6, en 12 maanden na behandeling. De botmassa-dichtheid (BMD) werd gemeten met behulp van dual-energy X-ray absorptiometrie (DEXA) en intact-PINP werd gemeten met de UniQ PINP RIA.

De data zijn gepresenteerd in tabel 3 en in figuur 3. De basale BMD was 0.740 ± 0.083 g/cm² (gemidd. ± SD) binnen de CTR, en 0.727 ± 0.104 g/cm² binnen de TRM groep. Binnen de TRM groep steeg het gemiddelde BMD met 6,0 % vanaf het basale tijdstip tot 12 maanden. De verandering was significant bij alle meettijdstippen vergeleken met de basiswaarde (p < 0.0001). De stijging in de CTR groep was kleiner en liep weer terug naar basiswaarden, gedurende 12 maanden. De basale PINP-concentratie in de CTR groep was 62.5 ± 18.5 µg/L en 61.1 ± 30.1 µg/L in de TRM groep. De gemid-delde PINP-concentratie in de TRM groep daalde met 70.8 % gedurende 12 maanden behandeling.

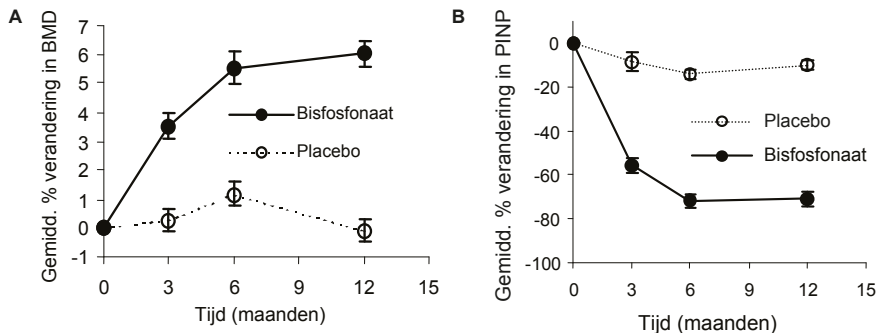
Bij alle drie meettijdstippen was de daling significant (p < 0.0001) ten opzichte van de basiswaarde. De daling binnen de CTR groep die ook calciumsuppletie kreeg was minder, 9,8 % gedurende 12 maanden.

De geobserveerde veranderingen in BMD en PINP tijdens behandeling met bifosfonaat, reflecteren de effecten die deze behandeling heeft op bot-remodeling. De resultaten waren zoals verwacht en gelijk aan eerdere rapportages die significante dalingen toonden van PINP-waarden tijdens behandeling van bifosfonaat.^{11, 30-31}

Tabel 3 De respons, weergegeven als de gemiddelde percentageverandering in BMD en PINP bij patiënten die bifosfonaat of een placebo kregen

Test	Behandelde groep	Gemiddelde percentageverandering (SD) vanaf de basiswaarde		
		3 maanden	6 maanden	12 maanden
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	-0.1 (3.2)
	Bifosfonaat	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	-8.6 (25.9)	-14.0 (25.5)	-9.8 (27.4)
	Bifosfonaat	-55.4 (34.0)	-71.6 (15.6)	-70.8 (15.5)

Fig. 3 De respons als de gemiddelde percentageverandering ($\pm$ SE bars) in (A) BMD and (B) PINP- concentratie bij patiënten die bisfosfonaat (●) of een placebo (○) krijgen.



Om een klinische significantie te verkrijgen dient de percentageverandering tussen de twee metingen, van zowel de analytische (Cva) alsook de intra-individuele (CV) variatie, hoger te zijn. Deze drempel wordt aangeduid als de minimum percentageverandering en kan als volgt worden berekend:

$$\text{Minimum-percentageverandering} = \sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV_a^2 + CV_b^2)}$$

Hormone-replacement-therapy (HRT)

De mogelijkheid van de UniQ PINP RIA om veranderingen in bot-remodeling aan te tonen tijdens hormone-replacement-therapy (HRT) bij postmenopausale vrouwen, werd bestudeerd in een gerandomiseerde, dubbelblinde dose-finding studie.³²⁻³³ De studiepersonen waren blijkbaar gezonde Finse vrouwen en tenminste 3 jaar in menopauze.

Data werden verkregen doormiddel van de behandeling van 44 personen die de laagste behandelingsdosis kregen: dagelijks 1 mg oraal estradiol-valeraat en 2,5 mg oraal medroxyprogesteron-acetaat. Patiënten werden geanalyseerd vanaf de basislijn en bij 6 en 12 maanden na behandeling. De BMD werd gemeten mbv dual-energy X-ray absorptiometrie (DEXA), intact-PINP werd gemeten mbv de UniQ PINP RIA.

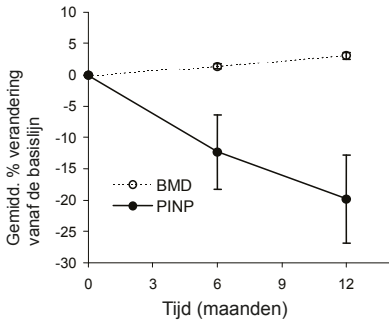
De data zijn weergegeven in tabel 4 en figuur 4. Op het basistijdstip was de BMD $1.083 \pm 0.182 \text{ g/cm}^2$ (gemidd. $\pm$ SD) en de PINP-concentratie was $42.2 \pm 15.3 \mu\text{g/L}$. Bij 6 maanden was de BMD verhoogd met gemiddeld 1.4 % en bij 12 maanden was de verhoging 3,1 % vanaf het basistijdstip. De PINP- waarde daalde na 6 maanden met 12.3 % t.o.v. de waarde van de basislijn en na 12 maanden met 19,8 %. De veranderingen van BMD en PINP waren, vergeleken met de basale waarde, significant ($p < 0.002$) bij beide meettijdstippen.

De geobserveerde veranderingen in BMD en intact-PINP tijdens HRT geven de effecten weer die de behandeling heeft op bot-remodeling, zelfs met de lage dosisbehandeling die in deze studie is gebruikt. Zoals verwacht waren de resultaten vergelijkbaar t.o.v. eerdere rapportages, allen toonden significante dalingen van PINP-waarden gedurende verschillende soorten van HRT.^{12-13, 15}

Tabel 4 Respons uitgedrukt als gemiddelde percentageverandering in BMD en PINP-concentratie bij postmenopausale patiënten die een lage dosis kregen, gecombineerd met HRT.

Test	Gemidd. % verandering (SD) vanaf de basistijdstip-waarde	
	6 maanden	12 maanden
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Fig. 4 Respons uitgedrukt als gemiddelde percentageverandering ($\pm$ SE bars) in BMD (o) en PINP-concentratie (•) bij postmenopausale vrouwen die een lage dosis kregen, gecombineerd met HRT.



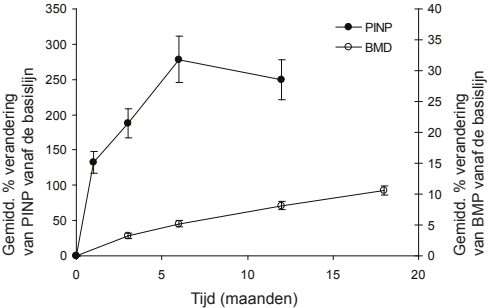
Teriparatide behandeling

Teriparatide, humaan parathyroid hormoon (PTH) 1–34, van recombinante DNA oorsprong, stimuleert de botaanmaak. De mogelijkheid van de UniQ PINP RIA om veranderingen in bot-remodeling weer te geven tijdens teriparatide therapie, tijdens behandeling van osteoporose, werd bestudeerd op 19 klinische locaties, gebruikmakend van een gerandomiseerd dubbelblind model.³⁴ De studiepersonen waren ambulante postmenopausale vrouwen met een gedefinieerde osteoporose, en tenminste 5 jaar in menopause. Een gedeelte van de personen kreeg tijdens de studie eenmaal per dag een dosis van 20 µg teriparatide, met een dagelijkse aanvulling van calcium (1000 mg) en vitamin D (400–800 IU). Retrospectief werden data verzameld van 62 patiënten van 64.9 $\pm$ 7.8 jaar (gemidd. $\pm$ SD) die teriparatide kregen en volledig waren ingesteld op BMD- en PINP-resultaten die waren verkregen op de geplande monstertijdstippen. De BMD van de lumbale wervelkolom (L1–L4) werd bij alle patiënten gemeten met DEXA, gebruikmakend van Lunar of Hologic densitometers, vanaf het basistijdstip en na 3, 6, 12 en 18 maanden teriparatide-behandeling. Intact-PINP werd gemeten vanaf het basistijdstip en 1, 3, 6 en 12 maanden na behandeling, gebruikmakend van de UniQ PINP RIA assay. Teriparatide therapie resulteerde in een gemiddelde BMD stijging tijdens de studieperiode, en met statistisch significante stijgingen bij alle meettijdstippen ($p < 0,0001$) vergeleken met het basistijdstip. De gemiddelde BMD steeg 0.025 g/cm² na 3 maanden, 0.039 g/cm² na 6 maanden, 0.061 g/cm² na 12 maanden en 0.079 g/cm² na 18 maanden. De gemiddelde PINP-concentratie steeg na 1 maand vanaf het basistijdstip met 59 µg/L, 82 µg/L na 3 maanden, 117 µg/L na 6 maanden, en 103 µg/L na 12 maanden. De stijging in PINP-concentratie, vergeleken met de waarde van het basistijdstip, was statistisch significant bij alle meetpunten ($p < 0,0001$). De percentageverandering voor BMD en PINP, vanaf het basistijdstip, werd berekend voor elk meettijdstip. De gemiddelde percentageveranderingen zijn weergegeven in tabel 5 en grafisch voorgesteld in figuur 5. De gemiddelde waarden voor PINP en BMD stegen als respons op de behandeling met teriparatide. De PINP-waarde was op zijn hoogst na 6 maanden, gevolgd door een lichte daling na 12 maanden, vergeleken met het 6-maanden-tijdstip. De gemiddelde BMD steeg als respons op de behandeling tot een maximale waarde die werd gezien op het eind van de studieperiode.

Tabel 5 Respons uitgedrukt als gemiddelde % verandering (± SD) in BMD en PINP-concentratie in 62 postmenopausale vrouwen met osteoporose die eenmaal per dag 20 µg teriparatide kregen.

Test	Verandering (gemidd. ± SD)	Verandering (gemidd. ± SD)	Verandering (gemidd. ± SD)	Verandering (gemidd. ± SD)	Verandering (gemidd. ± SD)
	1 maand	3 maanden	6 maanden	12 maanden	18 maanden
BMD	NA	3.3 ± 3.4 %	5.2 ± 3.8 %	8.1 ± 5.1 %	10.6 ± 5.6 %
PINP	132.6 ± 118.2 %	187.8 ± 164.2 %	278.5 ± 257.1 %	249.5 ± 221.7 %	NA

Fig. 5 Respons uitgedrukt als gemiddelde % verandering (± SE bars) in BMD en PINP concentratie in 62 postmenopausale vrouwen met osteoporose die eenmaal per dag 20 µg teriparatide kregen.



De geobserveerde veranderingen in BMD en intact-PINP-waarden geven het anabolisch effect weer van de teriparatide therapie op de bot-remodeling. Deze resultaten waren zoals verwacht en gelijkwaardig aan andere rapportages die significante stijgingen van PINP-waarden toonden tijdens de teriparatide behandeling.¹⁷⁻²⁰ Deels gebaseerd op hetzelfde klinische materiaal zoals in bovenstaande studie³⁴, is er een algoritme ontwikkeld om PINP te gebruiken om patiënten te monitoren, die zijn behandeld met teriparatide. Deze benadrukt nogmaals de klinische toepassing van PINP-metingen tijdens management van postmenopausale osteoporose.²¹

12. TESTKARAKTERISTIEKEN

Onderstaande resultaten werden verkregen bij Aidian en tonen typische testdata.

Lineariteit

De lineariteit van de UniQ PINP RIA werd onderzocht door monsters te verdunnen met de 0 µg/L kalibrator van de kit. Het percentage recovery werd berekend door de gemeten concentratie te delen door de verwachte waarde en vervolgens te vermenigvuldigen met 100.

Tabel 6 Lineariteit van de PINP-bepaling

Monster	Verdunning	Verwacht (µg/L)	Gemeten gemidd. (µg/L, n=4)	Berekend als onverdund (µg/L)	Recovery (%)
1	Basaal	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			Gemidd. SD CV %	189.3 12 6.3	
2	Basaal	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			Gemidd. SD CV %	79.9 2.4 3	

Precisie

De intra- en inter-assay precisie van de assay werd bepaald met behulp van serumpools en controlemonsters die verschillende concentraties PINP bevatten.

Tabel 7 Intra-assay / Inter-assay precisie

Intra-assay precisie van 18 of 20 replicaten			Inter-assay precisie 10 duplobepalingen		
Monster	Gemidd. (µg/L)	CV (%)	Monster	Gemidd. (µg/L)	CV (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Recovery

De recovery werd onderzocht door toevoeging van bekende hoeveelheden gezuiverd PINP-antigeen aan een monster dat 19,1 µg/L endogeen PINP bevatte. Het monster werd in duplo gemeten m.b.v de UniQ PINP RIA assay en vervolgens werd het percentage recovery berekend. Het percentage recovery is gelijk aan de verhoging van de concentratie, gedeeld door de spike-concentratie, en daarna vermenigvuldigd met 100.

Table 8 De recovery van de PINP-bepaling

Toegevoegd (µg/L)	Gemeten (µg/L)	Verhoging (µg/L)	Recovery (%)
–	19.1	–	–
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Specificiteit

De UniQ intact-PINP RIA assay is hoog specifiek voor intacte trimerische vormen van N-terminaal propeptide van het type I procollageen. De monomerische degradatieproducten van het PINP propeptide (Col1) met een laag molecuulairgewicht zijn gedetecteerd op een laag niveau (kruisreactiviteit van 2,7 %). De UniQ PINP RIA kruisreageert niet met het N-terminaal propeptide van type III procollageen (PIIINP).

Interfererende substanties

Een serum bilirubine concentratie < 400 µmol/L (< 23 mg/dL) interfereert niet met de bepaling. Serum haemoglobine-concentraties tot 5 g/L (500 mg/dL) of triglycerides tot 30 g/L (3000 mg/dL) interfereren niet met de bepaling.

Detectielimiet

De detectielimiet van de UniQ PINP RIA assay werd bepaald door meting van 20 replicaten van de 0 µg/L kalibrator en door de kalibratiecurve driemaal te meten met 4 replicaten. De minimaal detecteerbare PINP-concentratie van de bepaling was lager dan 2 µg/L, gedefinieerd als tweemaal de SD van de waarde van de 0-binding.

Meetrange

De meetrange van de UniQ PINP RIA is 5–250 µg/L.

13. TRACEERBAARHEID

Het te meten analyte in de UniQ PINP RIA kalibratoren is traceerbaar in de werkstandaarden van de producent, deze zijn bereid uit hoog zuiver PINP, de waarden hiervan zijn vastgesteld met behulp van de analyse van aminozuur-samenstellingen.

14. VERWIJDERING

- Verwijdering van de inhoud van de kit volgens nationale en lokale wetgevingen.
- Alle patiëntenmonsters en controles moeten worden behandeld en afgevoerd als potentieel infectieus materiaal.
- Radioactief afval dient te worden weggegooid volgens de voorgeschreven wetgevingen.
- Materialen van de kitcomponenten:
 - Papier: Gebruiksaanwijzingen
 - Karton: Kitdoos
 - Plastic: Scheidingsreagens fles, buisdoppen
 - Rubber: Stoppen
 - Glas: Flessen van tracer, antiserum, kalibratoren en controle
 - Foamrubber
- Bij gebruik volgens Good Laboratory Practice (GLP), inachtneming van goede hygiëne en opvolgen van de gebruiksaanwijzingen, vormen de geleverde reagentia geen gevaar voor de gezondheid.

UniQ® PINP RIA

Kit para la medición del propéptido intacto N-terminal del colágeno tipo 1 por radioinmunoensayo

1. APLICACIÓN

UniQ PINP RIA es un radioinmunoensayo cuantitativo diseñado para la medición de la concentración del propéptido intacto aminoterminal del procolágeno tipo I, indicador de la actividad osteoblástica, en suero humano. La prueba está diseñada para servir como ayuda en el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. ***Para uso en diagnóstico in Vitro.***

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El colágeno tipo I, que es sintetizado por fibroblastos y osteoblastos, es el tipo de colágeno que más abunda en el cuerpo y el único tipo de colágeno presente en el hueso mineralizado, donde representa más del 90 % de la matriz orgánica. Debido a que el hueso es el órgano colagenoso más importante y a que se mantiene metabólicamente muy activo durante toda su vida, la mayoría del colágeno sintetizado tipo I proviene de los osteoblastos óseos.

El colágeno tipo I deriva de una proteína de mayor tamaño, el procolágeno tipo¹, que está formado por 3 cadenas de aminoácidos que se entrelazan formando una triple hélice en forma de varilla. El procolágeno tipo I posee extensiones propeptídicas en ambos extremos de la molécula, que son eliminadas por proteinasas específicas antes de que las moléculas de colágeno formadas se ensamblen en fibras de colágeno. Ambos propéptidos pueden encontrarse en la circulación, donde su concentración refleja la tasa de síntesis del colágeno tipo¹. El ensayo UniQ PINP RIA mide la concentración sérica del propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (PINP).¹ Debido a que la concentración de esta extensión propeptídica es directamente proporcional a la cantidad de colágeno nuevo depositado en el hueso, puede utilizarse para valorar la formación ósea.

Durante la formación ósea, la matriz del hueso se produce antes de la mineralización; así, el PINP es un marcador temprano de la formación ósea. La fosfatasa alcalina ósea, una enzima de la membrana celular presente en preosteoblastos y osteoblastos, es otro marcador temprano de la actividad osteoblástica.² La osteocalcina es un marcador más tardío de la diferenciación osteoblástica que aparece en la fase de mineralización del hueso.³

El tejido óseo tiene una actividad metabólica remarcable y durante la vida se remodela constantemente. La remodelación ósea se consigue mediante dos procesos que se contrarrestan: la formación ósea y la resorción ósea, que bajo condiciones normales están estrechamente ligados entre sí. Las enfermedades metabólicas óseas se caracterizan por desequilibrios en el recambio óseo y a menudo conducen a una desunión entre la formación y la resorción óseas.⁴ Un indicador del recambio del colágeno tipo I, como el PINP, resulta muy útil para la investigación de la remodelación esquelética bajo condiciones normales y anormales. El ensayo UniQ PINP proporciona una herramienta sensible para la valoración del recambio óseo en mujeres posmenopáusicas⁵⁻⁹ y puede resultar especialmente útil en la monitorización de los efectos de las terapias antirresorción y anabólicas sobre el metabolismo óseo.¹⁰⁻²¹ La determinación del PINP también se ha utilizado para detectar aumentos en el recambio del colágeno tipo I en estados de enfermedad, por ejemplo en la enfermedad de Paget (osteitis deformante).²²⁻²⁴

3. PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

El kit de RIA PINP UniQ se basa en la técnica del radioinmunoensayo competitivo. Una cantidad conocida de PINP marcada y una cantidad desconocida de PINP no marcada de la muestra compiten por una cantidad de lugares de fijación de alta afinidad del anticuerpo policlonal anti-PINP de conejo. Se utiliza un segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo y recubierto con partículas de caolín, para separar el PINP fijado al anticuerpo del PINP libre. A continuación se mide la radiactividad del antígeno trazador fijado en un contador gamma. Después de separar el antígeno libre, la cantidad de PINP marcada en el tubo de la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de PINP contenida en la muestra. Las concentraciones en muestras desconocidas se obtienen a partir de una curva de calibración, que se basa en el muestreo simultáneo de calibradores RIA PINP UniQ que contienen de 0 a 250 µg/l PINP.

4. REACTIVOS

UniQ® PINP RIA, Cat. No. 67034

Nombre y origen del componente	Símbolo	 100	Estabilidad entre 2...8°C	
			Sin abrir	Abierto
Trazador	Ag ¹²⁵ I	22 ml Radioactividad < 200 kBq	Hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta	6 semanas
Antisuero ORIG RAB	Ab	22 ml	Hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta	6 semanas
Calibrador	CAL xxµg/l	7 x 0.5 ml	Hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta	6 semanas
Control ORIG HUM	CONTROL #	2 x 1.0 ml	Hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta	6 semanas después de la reconstitución
Reactivo de separación del procolágeno	REAG SEPAR	60 ml	Hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta	6 semanas
Instrucciones de uso				

Los reactivos contienen azida sódica como conservante, véase el apartado 15 "Advertencias y Precauciones".

Preparación de los reactivos

Los controles están liofilizados. Todos los demás reactivos están listos para usar.

Esperar a que los viales de control se encuentren a temperatura ambiente (18...25°C) antes de abrirlos. Reconstituir los controles añadiendo 1,0 ml de agua destilada o desionizada a cada vial. Tapar y mezclar a fondo arremolinando o invirtiendo los viales suavemente para evitar que se produzca espuma. Dejarlos reposar 30 minutos antes de utilizarlos.

Deterioro de los reactivos

Las alteraciones en el aspecto físico de los reactivos o en la pendiente de la curva de calibración, o unos valores del suero de control fuera del rango aceptado por el fabricante pueden indicar una posible inestabilidad del reactivo. No utilizar los reactivos si se sospecha que existe un deterioramiento del reactivo.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Información de seguridad y salud

- Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- No pipetear con la boca.
- Todas las muestras de pacientes y todos los controles se deben manejar como material potencialmente infeccioso.
- Los controles contienen material de origen humano, que se ha analizado y ha dado un resultado negativo para anticuerpos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH 1 y 2), virus de la hepatitis C (VHC) y antígeno de superficie de la hepatitis B (AgHBs). Como precaución, manejar los controles como si tuviera la posibilidad de transmitir agentes infecciosos.
- Los reactivos liofilizados contienen azida sódica en una concentración de <1% (Acuático crónico. 3). Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos (H412). En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos (EUH032). Evitar su liberación al medio ambiente (P273). Eliminar el contenido de acuerdo con la legislación nacional y local (P501). Las azidas pueden reaccionar con las cañerías metálicas, formando compuestos explosivos. La formación de compuestos de azida puede evitarse aclarando con agua abundante al desechar los reactivos.
- Los reactivos reconstituídos y los reactivos líquidos contienen azida sódica en una concentración del <0,1%, que no se considera perjudicial.
- El kit contiene ¹²⁵I (caducidad media $T_{1/2}$ de 60 días) que emite rayos gamma de 35,5 keV y rayos X de 27–32 keV. El material radioactivo que se incluye en este kit solo lo pueden recibir, adquirir, poseer y utilizar médicos, laboratorios clínicos, instituciones de investigación u hospitales y solo se puede utilizar para pruebas clínicas *in vitro* o pruebas de laboratorio que no impliquen la administración interna o externa del material, o la radiación del mismo a seres humanos o animales. Todos los materiales radioactivos solo deben almacenarse y manipularse en las áreas especialmente designadas. La adquisición, almacenamiento, uso o intercambio de productos radioactivos está sujeto a las leyes en vigor en el país del usuario.
- Evitar el contacto con ojos y piel. Tras el contacto con la piel, lavar la zona inmediatamente con agua abundante y descontaminar siguiendo las directrices para derrames.
- Los vertidos de materiales radioactivos deben limpiarse de inmediato con detergente y los materiales de limpieza contaminados se transferirán al contenedor de residuos radiactivos o se manipularán según las recomendaciones de la oficina de seguridad sobre radiación.
- Los materiales de residuos radioactivos deben eliminarse según las leyes aplicables. Consultar las normativas de radiación y los procedimientos aplicables en la institución sobre la manipulación, el almacenamiento y la eliminación de los materiales radioactivos.

Precauciones analíticas

- No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el envase exterior.
- No superar los periodos de estabilidad de los reactivos abiertos.
- No mezclar componentes de diferentes números de lotes o ensayos.

6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

No es necesaria ninguna preparación especial del paciente antes de la obtención de la muestra. Debe utilizarse suero, y debe recolectarse una muestra de sangre venosa utilizando una técnica médica aceptable, siguiendo las precauciones normales en recolecciones por venipuntura. No se debe utilizar este ensayo con muestras de plasma. Deben evitarse las muestras de paciente altamente lipémicas, hemolizadas o contaminadas microbiológicamente.

Manipulación y almacenamiento de la muestra

Después de la obtención de la muestra, permitir que la sangre se coagule y separar el suero por centrifugación. Las muestras de suero se pueden conservar a 2...8°C hasta 5 días o durante periodos más largos se puede almacenar a -20°C o inferior. Se debe evitar congelar y descongelar repetidamente las muestras. Las muestras con concentraciones elevadas de PINP pueden diluirse utilizando salino al 0,9%.

7. PROCEDIMIENTO

Consulte el apartado 4 "Reactivos", para obtener una lista de los reactivos.

Materiales necesarios pero no suministrados

- Pipetas (para la dispensación precisa de 50 µl, 200 µl, 500 µl, y 1000 µl)
- Tubos de la prueba (Poliestireno, por ejemplo 12 x 75 mm)
- Papel absorbente
- Película de parafina
- Agitador
- Baño de agua (capaz de mantener 37±1°C)
- Gradilla de decantación
- Centrifuga (capaz de alcanzar por lo menos 2000 g, preferentemente refrigerada)
- Contador gamma
- Agua destilada o desionizada

Detalles del procedimiento

1	Esperar a que todos los reactivos y las muestras se pongan a temperatura ambiente (18...25°C) antes de usarlos. Mezclar bien todos los reactivos invirtiendo suavemente los viales antes de usarlos.
2	Etiquetar los tubos de poliestireno por duplicado para la NSB (fijación no-específica), los calibradores, los controles, las muestras del paciente y las Cuentas Totales.
3	Pipetear 50 µl de los calibradores, de los controles y de la muestra de los pacientes en los tubos correspondientes. Pipetear cualquier muestra de paciente o el calibrador 0 µg/l en los tubos NSB.
4	Pipetear 200 µl del Trazador (rojo) en todos los tubos.
5	Pipetear 200 µl del Antisuero (azul) en todos los tubos exceptuando los NSB y las Cuentas Totales. Pipetear 200 µl de agua destilada o desionizada en los tubos NSB.
6	Mezclar todos los tubos en un agitador, cubrir con película de parafina e incubarlos durante 2 horas a 37±1°C.
7	Mezclar bien el Reactivo de Separación del Procolágeno invirtiendo el tubo suavemente. Añadir 500 µl a todos los tubos exceptuando las Cuentas Totales.
8	Mezclar los tubos utilizando el agitador e incubarlos durante 30 minutos a temperatura ambiente

9	Centrifugar todos los tubos exceptuando las Cuentas Totales durante 15 minutos a 2000 g a 4...20°C (se recomienda a 4°C).
10	Decantar los sobrenadantes de todos los tubos excepto las Cuentas Totales mediante su inversión simultánea. Golpear suavemente los tubos contra un material absorbente y dejar que se escurra durante unos segundos para retirar todo el líquido restante. Tener cuidado en no decantar el precipitado. No volver a invertir los tubos después de reponerlos derechos. Una decantación o escurrido defectuoso de los tubos puede resultar en una replicación baja y en valores erróneos.
11	Medir la radiactividad de cada tubo durante 1 minuto utilizando un contador gamma
12	Calcular los resultados tal como se describe en la sección “Cálculo de los resultados”

Procedimiento de la prueba – resumen

(todos los volúmenes se facilitan en µl)

	Total	NSB	Calibrador	Control y muestra
Pipetear la muestra		50	50	50
Pipetear el trazador (rojo)	200	200	200	200
Pipetear el antisuero (azul)			200	200
Pipetear el agua destilada / desionizada		200		
Mezclar		x	x	x
Incubar 2h a 37°C		x	x	x
Pipetear el reactivo de separación		500	500	500
Mezclar		x	x	x
Incubar 30 min a TA		x	x	x
Centrifugar 15 min / 2000 g		x	x	x
Decantar		x	x	x
Contar durante 1 min	x	x	x	x

8. CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda a todos los laboratorios clínicos aplicar un control de calidad interno, por lo que se sugiere analizar los sueros de control tanto en la fracción superior como en la inferior del rango de referencia para monitorizar el rendimiento del procedimiento. El ensayo RIA PINP UniQ proporciona dos materiales de control: los controles RIA PINP 1 y 2. Los rangos esperados de los controles se indican en una hoja aparte proporcionada con el ensayo. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios rangos aceptables para los controles utilizados en ese laboratorio. La media de control debería caer dentro del rango aceptable fijado por el fabricante. Se recomienda utilizar por lo menos kits de dos lotes distintos para asignar el valor del control. Una vez que se han establecido los rangos de control, deben realizarse los controles por duplicado en cada ensayo.

9. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Para procesar los resultados automáticamente, se recomienda ajustarlos a una curva de función "spline". Los resultados también se pueden obtener manualmente utilizando un papel semilogarítmico.

- **Calcular** la media de las cuentas para todos los calibradores, las muestras, los controles y la fijación no específica (NSB).
- **Calcular** el $\%B/B_0$ a partir de:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{cuenta del calibrador o de la muestra} - \text{NSB}}{\text{cuenta del calibrador} - \text{NSB}} \times 100$$

donde B es la radiactividad fijada de una muestra o un calibrador, B_0 es la radiactividad fijada del calibrador 0 y NSB es la radiactividad de la fijación no específica.

- **Trazar** una curva de calibración sobre papel semilogarítmico representando en el eje de ordenadas (eje y) los valores de $\%B/B_0$, y en el eje de abscisas (eje x) las concentraciones de PINP ($\mu\text{g/l}$) de los calibradores.
 - **Determinar** las concentraciones de PINP de los valores desconocidos en la curva de calibración.
 - **Cualquier muestra con una lectura que no alcance al calibrador inferior debe informarse como tal.**
 - **Cualquier muestra con una lectura que supere al calibrador superior debe diluirse y ser reanalizada.**
- Después de la dilución, los valores deben corregirse para contabilizar el factor de dilución.

Fig. 1 Curva de calibración típica

Esta curva sirve solamente como ilustración.

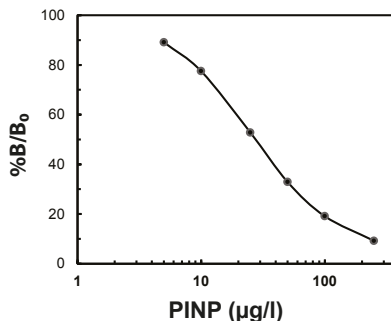


Tabla 1 Cálculo de resultados utilizando datos típicos.

Cálculo de resultados utilizando datos típicos. Esta curva sirve solamente como ilustración y no debe utilizarse para el cálculo de ningún resultado de la muestra.

Tubo	media cpm	NSB -cpm	$\%B/B_0$	PINP ($\mu\text{g/l}$)
Total	50970			
NSB	845			
Cal 0	28330	27485		
Cal 5.0	25343	24498	89.1	
Cal 10	22143	21289	77.5	
Cal 25	15344	14499	52.8	
Cal 50	9897	9052	32.9	
Cal 100	6095	5250	19.1	
Cal 250	3379	2534	9.2	
Desc 1	10725	9880	35.9	44.6
Desc 2	4572	3727	13.6	157

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los resultados de este ensayo deben utilizarse conjuntamente con otras informaciones clínicas relevantes para el diagnóstico y la toma de decisiones de carácter terapéutico. Así, no se recomienda el ensayo PINP UniQ para su utilización como proceso de filtro para detectar la presencia de osteoporosis en la población general.

Al evaluar las muestras subsiguientes, recoger las muestras a la misma hora cada día, ya que existe una variación diurna en los valores de PINP, que ascienden durante la noche.

El colágeno tipo I también se sintetiza por fibroblastos y, por tanto, puede encontrarse en tejidos conectivos junto con otros tipos de colágeno. Aún así, puesto que el hueso es el órgano más colagenoso y que permanece metabólicamente activo durante toda la vida, la mayoría del PINP en circulación es de origen osteoblástico.²⁵

El PINP se metaboliza en el hígado.²⁶ Una enfermedad severa del hígado puede afectar su eliminación renal de la circulación y provocar niveles elevados de PINP en suero.²⁷

Igual que en la mayoría de ensayos que utilizan anticuerpos secundarios, las muestras que contengan anticuerpos (por ejemplo anticuerpos heterofílicos) que reaccionen frente a IgG de conejo/cabra pueden provocar resultados erróneos.

11. VALORES ESPERADOS

Debido a las variaciones étnicas, dietéticas y relacionadas con la edad, los límites de referencia suministrados pueden no ser aplicables a todas las poblaciones. Los rangos de observaciones abajo indicados son solamente representativos, y no reflejan necesariamente los rangos que se observarán en un entorno clínico específico.

Se midieron los niveles de PINP de sujetos blancos finlandeses aparentemente sanos utilizando el Kit UniQ PINP RIA. Se utilizó el método no paramétrico recomendado por el IFCC para calcular los intervalos de referencia de los límites superior e inferior.²⁸

Cada laboratorio debería establecer sus propios valores esperados representativos para la población local.

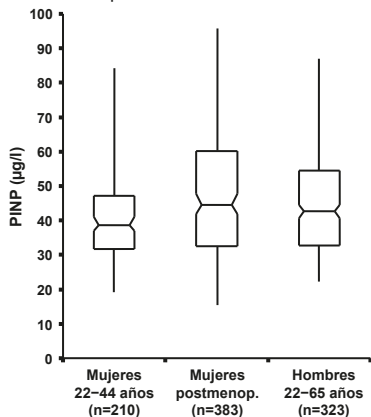
Tabla 2 Valores esperados del PINP sérico

	Mujeres	Mujeres posmenopáusicas*	Hombres
Edad, años	25–44	52–62	22–65
Cantidad de sujetos	210	383	323
Media	42 µg/l	48 µg/l	45 µg/l
Mediana	39 µg/l	45 µg/l	43 µg/l
Intervalo de referencia**	19–83 µg/l	16–96 µg/l	22–87 µg/l
0,95–intervalos de confianza			
para el límite de referencia inferior	14–23 µg/l	15–19 µg/l	20–25 µg/l
para el límite de referencia superior	71–96 µg/l	87–103 µg/l	77–94 µg/l

* Mínimo 3 años posmenopáusica

**Intervalo de referencia = fractiles 0,025 y 0,975

Fig. 2 Gráfico de la distribución de las concentraciones PINP en adultos aparentemente sanos. La línea horizontal de cada caja representa el valor mediano, mientras que los límites inferior y superior de las cajas indican los rangos de los intercuartiles, es decir, valores un 25% por encima y por debajo del valor mediano. Las puntas de las líneas muestran los límites del rango de referencia (los fractiles 0,025 y 0,975).



Los resultados arriba presentados demuestran que las concentraciones de PINP en una población de mujeres posmenopáusicas son elevadas comparadas con las concentraciones en mujeres de 25-44 años (prueba de Mann Whitney, $p=0,0005$). Este incremento del PINP muestra el incremento en la remodelación ósea asociado con una deficiencia de estrógenos en una población posmenopáusica en comparación con una población más joven. Aún así, existe un solapamiento considerable de las concentraciones de PINP de las dos poblaciones.

ESTUDIOS CLÍNICOS

Tratamiento por bisfosfonato

Se estudió la utilidad del RIA PINP UniQ en la monitorización de cambios en la remodelación ósea durante un tratamiento por bisfosfonato (10 mg diarios de alendronato) en un estudio multilocal, prospectivo, controlado con placebo doble-cego sobre mujeres posmenopáusicas de la población de los Estados Unidos con osteoporosis definida, con al menos 5 años desde la aparición de la menopausia.²⁹ Se disponía de datos de 124 pacientes aleatoriamente agrupados en dos grupos: 62 recibieron el tratamiento (TRM) y 62 recibieron placebo (CTR). Todos los sujetos del estudio recibieron 500 mg/día de calcio como suplemento. Los pacientes se analizaron en el momento de referencia y a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento. Se midió la densidad mineral ósea (BMD) mediante absorciometría de rayos x de energía dual (DXA) y se midió la PINP intacta utilizando el RIA PINP UniQ.

Los datos se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 3. En el punto de partida la BMD era de $0,740 \pm 0,083$ g/cm² (media $\pm$ Desviación Estándar) en el grupo CTR, y de $0,727 \pm 0,104$ g/cm² en el grupo TRM. La BMD media del grupo TRM se incrementó un 6,0% desde el punto de partida hasta los 12 meses de tratamiento. El cambio fue significativo en todos los momentos temporales en comparación con el punto de partida ($p < 0,0001$). El aumento en el grupo CTR fue inferior, con un retorno transitorio al punto de partida a los 12 meses de tratamiento.

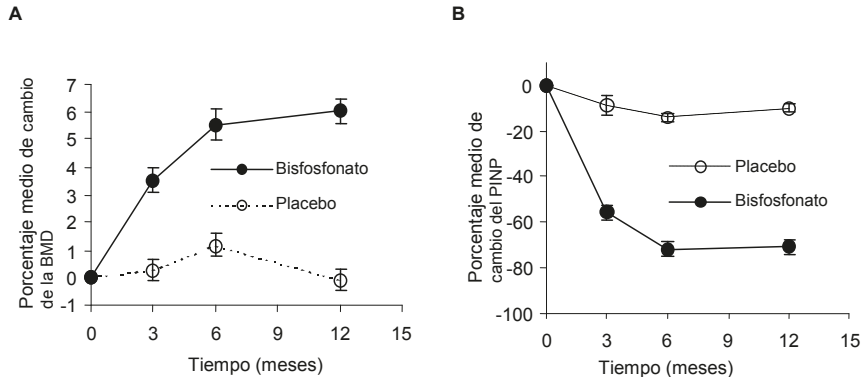
En el momento de referencia la concentración de PINP era de $62,5 \pm 18,5$ µg/l en el grupo CTR y de $61,1 \pm 30,1$ µg/l en el grupo TRM. La concentración media de PINP en el grupo TRM disminuyó un 70,8% a los 12 meses de tratamiento. En los tres puntos temporales de referencia el descenso fue significativo ($p < 0,0001$) comparados con el punto de partida. El descenso en el grupo CTR, que también recibía el suplemento cálcico, fue inferior, siendo del 9,8% a los 12 meses de tratamiento.

Los cambios de BMD y PINP observados durante el tratamiento por bisfosfonato reflejan los efectos que este tratamiento tienen sobre la remodelación ósea. Los resultados fueron los esperados y similares a los informes anteriores, los cuales no han mostrado un descenso significativo de los niveles de PINP durante el tratamiento por bisfosfonato.^{11, 30-31}

Tabla 3 Respuesta representada como cambio en el porcentaje medio de BMD y PINP en pacientes que reciben bisfosfonato o placebo.

Prueba	Grupo de tratamiento	Porcentaje medio de cambio (SD) desde el valor del punto de partida		
		3 meses	6 meses	12 meses
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	-0.1 (3.2)
	Bisfosfonato	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	-8.6 (25.9)	-14.0 (25.5)	-9.8 (27.4)
	Bisfosfonato	-55.4 (34.0)	-71.6 (15.6)	-70.8 (15.5)

Fig. 3 Respuesta expresada como cambio porcentual de la media (± barras de error estándar) en concentraciones de (A) BMD y (B) PINP en pacientes receptores de bisfosfonato (●) o placebo (○).



Para tener significancia clínica, el cambio porcentual entre dos mediciones debe sobrepasar tanto la variación analítica (CVa) como la intraindividual (CVi). Este umbral equivale al cambio porcentual mínimo y puede calcularse de la siguiente manera:

Cambio Porcentual Mínimo = $\sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV_i^2 + CV_a^2)}$

Se han descrito diversos valores para el PINP, por ejemplo, Hannon y sus co-trabajadores¹² han reportado un cambio porcentual mínimo del PINP del 21%.

Terapia de reemplazo hormonal

La habilidad del RIA PINP UniQ para reflejar los cambios en la remodelación ósea durante la terapia de reemplazo hormonal (HRT) en mujeres posmenopáusicas se estudió en un estudio aleatorizado, doble-ciego, de búsqueda de dosis.³²⁻³³ Los sujetos del estudio eran mujeres finlandesas aparentemente sanas con al menos 3 años desde la menopausia. Se disponía de datos del brazo tratado de 44 sujetos que recibían la dosis mínima de tratamiento: 1 mg estradiol valerato oral y 2,5 mg de medroxiprogesterona acetato oral diariamente. Las pacientes se analizaron en el punto de partida y a los 6 y 12 meses de tratamiento. Se midió la BMD mediante absorciometría de rayos x de energía dual y se midió la PINP intacta utilizando el RIA PINP UniQ.

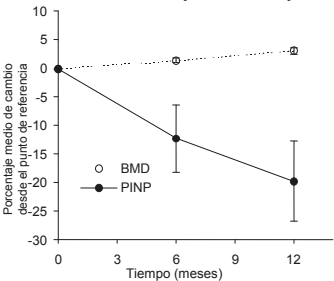
Los datos se presentan en la Tabla 4 y en la Figura 4. El valor de referencia de la BMD en el punto de partida era de 1,083 ± 0,182 g/cm² (media ± SD) y la concentración de PINP era de 42,2 ± 15,3 µg/l. Al cabo de 6 meses la BMD se había incrementado un 1,4% de media y al cabo de 12 meses el incremento había sido de un 3,1% respecto al valor de referencia. A los 6 meses la PINP había descendido un 12,3% respecto al valor de referencia y un 19,8% a los 12 meses de tratamiento. Los cambios en la BMD y la PINP fueron significativos (p < 0,002) en los dos puntos temporales comparados con el valor de referencia.

Los cambios observados en la BMD y en la PINP intacta durante el tratamiento por HRT reflejan los efectos que tiene este tratamiento sobre la remodelación ósea en tratamientos de dosis bajas. Los resultados fueron los esperados y fueron similares a informes anteriores, que mostraban descensos significativos en los niveles de PINP durante diferentes tipos de terapias de reemplazo hormonal.^{12-13, 15}

Tabla 4 Respuesta, reflejada como cambio porcentual mínimo, en la concentración de BMD y PINP en pacientes posmenopáusicas que reciben dosis bajas combinadas con terapia de reemplazo hormonal.

Prueba	Cambio porcentual mínimo (SD) desde el valor de referencia	
	6 meses	12 meses
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Fig. 4 Respuesta, reflejada como cambio porcentual mínimo (± barras SE –de error estándar) en las concentraciones de BMD (○) y de PINP (●) en mujeres posmenopáusicas que reciben dosis bajas combinadas con terapia de reemplazo hormonal.



Tratamiento con teriparatida

Teriparatida, la hormona paratiriodea humana (PTH) 1–34, de origen ADN recombinante, estimula la formación de hueso. La capacidad del RIA PINP UniQ para reflejar los cambios en la remodelación ósea después de la terapia con la teriparatida en el tratamiento de la osteoporosis se estudió en 19 sitios clínicos utilizando un diseño doble ciego aleatorizado.³⁴ Los sujetos del estudio eran mujeres ambulatorias post-menopáusicas con la osteoporosis definida, con al menos 5 años desde la menopausia. Un subconjunto de los sujetos recibió una dosis de 20 mg de teriparatida una vez al día con la suplementación diaria de calcio (1 000 mg) y la vitamina D (400-800 UI) durante

todo el estudio. Retrospectivamente, se recogieron datos de 62 pacientes de edad de 64.9 ± 7.8 años (media $\pm$ DE) recibiendo teriparatida y teniendo conjuntos completos de los resultados de la BMD y el PINP disponibles en los puntos de muestreo programados. Se midió la BMD de la columna lumbar (L1-L4) en todos los pacientes con DXA utilizando densitómetros Lunar o Hologic al inicio del estudio y a los 3, 6, 12 y 18 meses de tratamiento con la teriparatida. El PINP intacto se midió al inicio del estudio y a los 1, 3, 6 y 12 meses de tratamiento utilizando el ensayo de RIA PINP UniQ.

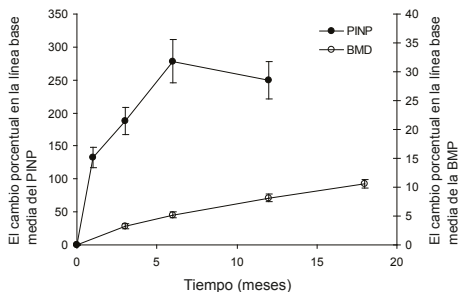
La terapia con la teriparatida resultó en un incremento medio de la BMD durante todo el período de estudio, con los incrementos estadísticamente significativos en todos los puntos ($p < 0.0001$) en comparación con la línea base. La media de la BMD se aumentó en 0.025 g/cm^2 a los 3 meses, en 0.039 g/cm^2 a los 12 meses y en 0.079 g/cm^2 a los 18 meses. La concentración media del PINP se aumentó en $59 \mu\text{g/l}$ desde la línea base en 1 mes, en $82 \mu\text{g/l}$ en 3 meses, en $117 \mu\text{g/l}$ en 6 meses y en $103 \mu\text{g/l}$ en 12 meses. El aumento en la concentración del PINP en comparación con el valor basal fue estadísticamente significativo en todos los puntos temporales ($p < 0.0001$).

Se calculó el cambio porcentual desde el valor inicial para la BMD y el PINP en cada punto temporal. Los cambios medios porcentuales se muestran en la Tabla 5 y representan gráficamente en la Figura 5. Los valores medios del PINP y la BMD aumentaron en respuesta al tratamiento con la teriparatida. El PINP alcanzó su punto máximo a los 6 meses, seguido de una disminución ligera a los 12 meses en comparación con el punto de tiempo de 6 meses. La media de la BMD se aumentó en respuesta al tratamiento con el valor máximo observado al final del período de estudio.

Tabla 5 Cambio porcentual mínimo ($\pm$ SD) en la concentración de BMD y PINP en 62 mujeres posmenopáusicas con osteoporosis recibiendo una dosis diaria de $20 \mu\text{g}$ de teriparatide.

Test	Cambio (media $\pm$ SD)	Cambio (media $\pm$ SD)	Cambio (media $\pm$ SD)	Cambio (media $\pm$ SD)	Cambio (media $\pm$ SD)
	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses	18 meses
BMD	NA	$3.3 \pm 3.4 \%$	$5.2 \pm 3.8 \%$	$8.1 \pm 5.1 \%$	$10.6 \pm 5.6 \%$
PINP	$132.6 \pm 118.2 \%$	$187.8 \pm 164.2 \%$	$278.5 \pm 257.1 \%$	$249.5 \pm 221.7 \%$	NA

Fig. 5 Cambio porcentual mínimo ($\pm$ barras SE) en las concentraciones de BMD y PINP en 62 mujeres posmenopáusicas con osteoporosis recibiendo una dosis diaria de $20 \mu\text{g}$ de teriparatide.



Los cambios observados en los niveles de BMD y PINP reflejan un efecto anabólico en el tratamiento con teriparatide en el remodelado óseo. Estos resultados fueron como se esperaba similares a otros estudios, los cuales muestran incrementos significativos de los niveles de PINP durante el tratamiento con teriparatide.¹⁷⁻²⁰ Prácticamente basado en el mismo material clínico como en el presente estudio³⁴, se ha desarrollado un algoritmo por el uso de el PINP como monitorización de los pacientes tratados con teriparatide, lo cual confirma la utilidad clínica de la medición del PINP en el tratamiento de la osteoporosis posmenopausia.²¹

12. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Los resultados que se presentan a continuación han sido obtenidos por Aidian y representan los datos de rendimiento usuales.

Linealidad

La linealidad del ensayo RIA PINP UniQ se estudió diluyendo muestras con el calibrador 0 µg/l incluido en el kit. El porcentaje de recuperación se calculó dividiendo la concentración medida por la concentración esperada y multiplicando el valor obtenido por 100.

Tabla 6 La Linealidad del ensayo PINP

Muestra	Dilución	Esperado (µg/l)	Media medida (µg/l, n = 4)	Calculado sin diluir (µg/l)	Recuperación (%)
1	Puro	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			Media	189.3	
			SD	12	
2	Puro	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			Media	79.9	
			SD	2.4	
			CV %	3	

Precisión

Se determinó la precisión intra e inter-ensayo del ensayo utilizando mezclas de suero y muestras de control con diferentes concentraciones de PINP.

Tabla 7 Precisión intraensayo / interensayo

Precisión intraensayo de 18 o 20 réplicas			Precisión interensayo de 10 determinaciones duplicadas		
Muestra	Media (µg/l)	CV (%)	Muestra	Media (µg/l)	CV (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Recuperación

Se estudió la recuperación añadiendo cantidades conocidas de antígeno PINP purificado a una muestra con 19,1 µg/l de PINP endógeno. Se midió la muestra por duplicado utilizando el ensayo RIA PINP UniQ y se calculó el % de recuperación. El porcentaje de recuperación es igual al aumento en la concentración dividido por la concentración de la mezcla multiplicado por 100.

Tabla 8 Recuperación / PINP

Concentración (spike) (µg/l)	Medido (µg/l)	Incremento (µg/l)	Recuperación (%)
—	19.1	—	—
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Especificidad

El kit del UniQ PINP intacto RIA es altamente específico para formas triméricas intactas del propéptido N-terminal del procolágeno tipo I. Los productos de degradación monomérica de peso molecular bajo del propéptido PINP (Col1) se detectan en niveles bajos (reactividad cruzada del 2,7 %). UniQ PINP RIA no presenta reactividad cruzada con el propéptido N-terminal del procolágeno tipo III (PIIINP).

Sustancias interferidoras

Las concentraciones de bilirubina en suero <400 µmol/l (< 23 mg/dL) no interfieren con el ensayo. Las concentraciones de hemoglobina en suero hasta 5 g/l (500 mg/dL) y de triglicéridos hasta 30 g/l (3000 mg/dL) tampoco interfieren con el ensayo.

Límite de detección

El límite de detección del ensayo RIA PINP UniQ se determinó midiendo 20 réplicas del calibrador 0 µg/l y la curva de calibración (4 réplicas) 3 veces.

La concentración mínima detectable de PINP en el ensayo fue < 2 µg/l, definido como dos veces la desviación estándar del valor de fijación cero.

Rango de medición

El rango de medición del RIA PINP UniQ es de 5–250 µg/l.

13. TRAZABILIDAD

El antígeno en los calibradores RIA PINP UniQ se puede trazar en conformidad con los calibradores funcionales del fabricante, que están elaborados con PINP altamente purificado con un valor asignado mediante análisis de composición de aminoácidos.

14. ELIMINACIÓN DE DESECHOS

- Eliminar el contenido en de acuerdo con la legislación nacional y local.
- Todas las muestras de pacientes y todos los controles se deben manejar como material potencialmente infeccioso.
- Los materiales de residuos radioactivos deben eliminarse según las leyes aplicables.
- Materiales de los componentes:
 - Papel: instrucciones de uso
 - Cartón: caja del kit
 - Plástico: botella del reactivo de separación, tapas de frascos
 - Caucho: tapones
 - Vidrio: frascos de trazador, antisuero, calibrador, control
 - Gomaespuma
- Utilizados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, una higiene laboral correcta y estas instrucciones de uso, los reactivos suministrados no deben suponer un peligro para la salud.

UniQ® PINP RIA

Propeptide N Terminale del Collagene di tipo I, Kit Radioimmunologico

1. USO DEL KIT

Il kit UniQ PINP RIA è un test radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del Propeptide N Terminale del Collagene di tipo I nel siero umano, come indicatore dell'attività osteoblastica. Il test serve come aiuto nella gestione dell'osteoporosi post-menopausale.

Per uso diagnostico *in vitro*.

2. IMPORTANZA CLINICA DEL PINP

Il collagene di tipo I, sintetizzato dai fibroblasti e dagli osteoblasti, è il collagene più abbondante; è l'unico tipo di collagene presente nell'osso mineralizzato e costituisce circa il 90% della matrice organica. Poiché l'osso rappresenta l'organo più ricco di collagene e ha un metabolismo attivo in tutte le fasi della vita, la maggior parte del collagene di tipo I viene quindi sintetizzato dagli osteoblasti.

Il collagene di Tipo I deriva da proteina di maggior peso molecolare, il procollagene di Tipo I, che consiste di tre catene aminoacidiche associate a formare una tripla elica. Il procollagene di tipo I presenta estensioni propeptidiche (telomeri) in entrambe le estremità della molecola, che vengono rimosse da proteinasi specifiche prima che le molecole di collagene vengano unite per formare le fibrille di collagene. Entrambi i propeptidi sono presenti in circolo e la loro concentrazione riflette la velocità di sintesi del collagene di Tipo I. Il kit UniQ PINP RIA misura la concentrazione sierica del propeptide aminoterminale del Procollagene di tipo I (PINP).¹ La concentrazione del telomero N-terminale è direttamente proporzionale alla quantità di nuovo collagene depositato nell'osso e può quindi essere utilizzata per determinare la formazione ossea. Durante la formazione ossea la matrice ossea è prodotta prima che avvenga la mineralizzazione e, di conseguenza, il PINP ne è un marcatore precoce. La fosfatasi alcalina ossea, un enzima della membrana cellulare presente in pre-osteoblasti e osteoblasti, è un altro marcatore precoce di attività osteoblastica². L'osteocalcina è un marker più tardivo di differenziazione osteoblastica e compare nella fase di mineralizzazione ossea³. Il tessuto osseo ha una attività metabolica molto elevata e per tutta la durata della vita è sottoposto ad un continuo rimodellamento. Il rimodellamento osseo è dovuto a due processi contrapposti: la formazione ossea e il riassorbimento osseo, che in condizioni normali sono strettamente in equilibrio tra loro. La malattia metabolica dell'osso ha come caratteristica lo sbilanciamento del turnover osseo e spesso porta ad un disequilibrio tra formazione e riassorbimento osseo⁴. Un indicatore metabolico del collagene di tipo I, come il PINP, è molto utile per studiare il rimodellamento scheletrico in condizioni normali e patologiche.

Il kit UniQ PINP è uno strumento sensibile per determinare l'aumento del metabolismo osseo in donne in post-menopausa⁵⁻⁹ e può essere particolarmente utile per valutare l'effetto della terapia anti riassorbimento e anabolizzante sul metabolismo osseo¹⁰⁻²¹. La determinazione del PINP è anche stata utilizzata per rilevare l'incremento del metabolismo del collagene di tipo I in condizioni patologiche come nella malattia di Paget.²²⁻²⁴

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test UniQ PIIINP RIA è un metodo radioimmunologico competitivo.

Campioni e calibratori contenenti PINP competono con PINP marcato con ^{125}I per un numero limitato di siti di un anticorpo policlonale da coniglio ad alta affinità anti PINP. Viene utilizzato un secondo anticorpo, diretto contro le IgG di coniglio e legato a particelle di caolino, per separare il PINP legato all'anticorpo dal PINP libero. La radioattività nelle provette è inversamente proporzionale alla concentrazione di PINP in campioni e calibratori. Si traccia una curva di taratura a concentrazioni di PINP comprese tra 0 e 250 $\mu\text{g/L}$ e si calcolano per interpolazione sulla curva le concentrazioni dei campioni.

4. REATTIVI

UniQ® PINP RIA, Cat. N. 67034

Nome del componente e l'origine	Simbol	 100	Stabilità a 2...8°C	
			Non aperto	Aperto
Marcato	Ag ^{125}I	22 ml Radioattività < 200 kBq	Fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta	6 settimane
Anticorpo ORIG RAB	Ab	22 ml	Fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta	6 settimane
Calibratore	CAL xx $\mu\text{g/L}$	7 x 0.5 ml	Fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta	6 settimane
Controllo ORIG HUM	CONTROL #	2 x 1.0 ml	Fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta	6 settimane dopo la ricostituzione
Reattivo di separazione	REAG SEPAR	60 ml	Fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta	6 settimane
Istruzioni per l'uso				

I reagenti contengono sodio azide come conservante, consultare il capitolo 5 "Avvertenze e le Precauzioni".

Preparazione dei reagenti

I controlli sono liofilizzati. Tutti gli altri reagenti sono pronti all'uso.

Permettere ai flaconi dei controlli di raggiungere l'equilibrio a temperatura ambiente (18...25°C) prima di aprirli. Ricostituire i controlli aggiungendo 1,0 mL di acqua distillata ad entrambi i flaconi. Tappare e agitare bene per inversione evitando la formazione di schiuma. Attendere 30 minuti prima di utilizzare i controlli ricostituiti.

Deterioramento dei reagenti

Alterazioni nell'aspetto fisico dei reagenti o nella pendenza della curva di calibrazione, o valori dei sieri di controllo al di fuori dell'intervallo accettabile fornito dal produttore possono essere indicatori di instabilità del reagente. Non utilizzare i reagenti se si sospetta deterioramento del reagente.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Informazioni sulla salute e la sicurezza

- Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
- Non pipettare con la bocca.
- Tutti i campioni dei pazienti e i controlli devono essere manipolati come materiali potenzialmente infetti.
- I controlli contengono materiale di origine umana, testato e riscontrato negativo agli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV 1 e 2), al virus dell'epatite (HCV) e all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg). A scopo cautelativo, manipolare i controlli come materiale potenzialmente infetto.
- I reagenti liofilizzati contengono una concentrazione di sodio azide pari al < 1 % (Aquatic Chronic 3). Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata (H412). A contatto con acidi libera gas molto tossici (EUH032). Non disperdere nell'ambiente (P273). Smaltire il prodotto in conformità alla regolamentazione nazionale e locale (P501). Le azidi possono reagire con le tubature metalliche formando composti esplosivi. L'accumulo di azide può essere evitato effettuando un abbondante risciacquo con acqua prima di smaltire i reagenti.
- I reagenti liquidi e ricostituiti contengono sodio azide < 0,1%, concentrazione che non è considerata pericolosa.
- Il kit contiene ^{125}I (emivita $t_{1/2} = 60$ giorni) emittente raggi gamma (35,5 keV) e raggi X (27-32 keV). Il materiale radioattivo contenuto in questo kit può essere ricevuto, acquisito, posseduto e utilizzato esclusivamente da medici, laboratori clinici, istituti di ricerca od ospedali e può essere utilizzato esclusivamente per test *in vitro* clinici e di laboratorio che non implicino un'amministrazione interna o esterna del materiale né la radiazione da esso derivante per essere umani e animali. Tutti i materiali radioattivi devono essere conservati e manipolati esclusivamente in aree appositamente designate. L'acquisto, la conservazione, l'uso o lo scambio di prodotti radioattivi è soggetto alle leggi vigenti nel paese dell'utente.
- Evitare il contatto con la pelle e con gli occhi. In caso di contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua e decontaminare, seguendo le linee guida dei vostri istituti in caso di contattato accidentale.
- Fuoriuscite di materiali radioattivi devono essere pulite immediatamente con un detergente e i materiali contaminati usati per la pulizia devono essere eliminati nel contenitore di rifiuti radioattivi o manipolati in conformità alle raccomandazioni dell'ufficio incaricato della protezione dalle radiazioni.
- I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti in conformità alle leggi applicabili. Per la manipolazione, la conservazione e lo smaltimento dei materiali radioattivi, fare riferimento alle norme e alle procedure relative alle radiazioni applicabili al proprio istituto.

Precauzioni analitiche

- Non utilizzare il prodotto dopo la data di scadenza indicata sull'esterno della confezione.
- Non superare i periodi di stabilità dei reagenti aperti.
- Non mischiare componenti di numeri di lotto o test differenti.

6. RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Non è richiesta alcuna speciale preparazione del paziente prima della raccolta del campione. Utilizzare campioni di siero ottenuti da normali prelievi venosi. Non è possibile dosare campioni di plasma. Evitare di testare sieri fortemente lipemici, emolizzati o contaminati microbiologicamente.

Manipolazione e conservazione dei campioni

Utilizzare campioni di siero ottenuti da prelievo di sangue venoso periferico, ottenuto secondo le tecniche consuete. I campioni possono essere conservati, fino a 5 giorni a 2–8°C o, suddivisi in aliquote, a –20°C per periodi più lunghi. Evitare ripetuti cicli di congelamento – scongelamento dei campioni.

Campioni con elevate concentrazioni di PINP devono essere diluiti con fisiologica (NaCl 0,9%).

7. PROCEDURA

Consultare il capitolo 4 “Reattivi”.

Materiale richiesto ma non fornito

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

- Pipette (50 µL, 200 µL, 500 µL e 1 mL)
- Provette (polistirene, 12 x 75 mm)
- Carta assorbente
- Parafilm
- Mixer tipo Vortex
- Bagno d'acqua (capace di mantenere 37±1°C)
- Supporto per la decantazione
- Centrifuga (capacità di almeno 2000 g
Se disponibile, refrigerata)
- Gamma counter
- Acqua distillata o deionizzata

Strumentazione

Ogni gamma counter in grado di misurare I¹²⁵ può essere utilizzato. L'efficienza del conteggio dello strumento dovrebbe essere regolarmente controllata. E' raccomandato calibrare lo strumento sistematicamente. Consultare il manuale operativo fornito dal costruttore dello strumento per i dettagli per l'installazione, l'utilizzo, la manutenzione e la calibrazione.

Metodo del dosaggio in dettaglio

1	Portare i reattivi a temperatura ambiente (18...25°C) prima dell'uso.
2	Numerare in duplicato le provette necessarie per il dosaggio di NSB, calibratori, controlli e campioni e due provette per la determinazione dell'attività totale.
3	Pipettare 50 µL di calibratori, controlli e campioni nelle rispettive provette. Pipettare 50 µL di un campione qualsiasi nelle provette per gli NSB. Non pipettare nulla nelle provette per l'attività totale.
4	Aggiungere in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale, 200 µL di marcato (rosso).
5	Pipettare 200 µL di anticorpo (blu) in tutte le provette eccetto quelle per gli NSB e per l'attività totale. Pipettare 200 µL di acqua distillata o deionizzata nelle provette per gli NSB.
6	Agitare brevemente tutte le provette con vortex, coprire le provette con parafilm e incubarle 2 ore a 37±1°C in bagno termostato.
7	Agitare per inversione il reattivo precipitante e dispensarne 500 mL in tutte le provette eccetto quelle per l'attività totale.
8	Agitare le provette su vortex e incubarle 30 minuti a temperatura ambiente (18...25°C).
9	Centrifugare tutte le provette, eccetto quelle per l'attività totale, 15 minuti a 2000 g (minimo) a 4...20°C (temperatura raccomandata 4°C).

10	Decantare le provette, eccetto quelle per l'attività totale, e lasciarle capovolte su un foglio di carta assorbente. Picchiettare delicatamente sul fondo le provette per allontanare il liquido residuo. Fare attenzione a non provocare il distacco del precipitato dal fondo delle provette. Una volta riportate le provette in posizione verticale, non capovolgerle di nuovo. Una decantazione incompleta può generare risultati non corretti.
11	Contare le provette in un contatore gamma per almeno un minuto.
12	Calcolare i risultati come descritto nel paragrafo "Calcolo dei risultati".

Procedura del test – Sommario

(Tutti volumi sono riportati in µL)

	Totale	NSB	Calibratore	Controllo/Campione
Pipettare il campione		50	50	50
Pipettare il tracciante (rosso)	200	200	200	200
Pipettare l'antisiero (blu)			200	200
Pipettare l'acqua distillata		200		
Agitare		x	x	x
Incubare 2 ore a 37°C		x	x	x
Pipettare il reattivo di separazione		500	500	500
Agitare		x	x	x
Incubare per 30 minuti a 18...25°C		x	x	x
Centrifugare per 15 minuti / 2000 g		x	x	x
Decantare		x	x	x
Contare per 1 minuto o 10 000 conte	x	x	x	x

8. CONTROLLO DI QUALITÀ

Si raccomanda ad ogni laboratorio di utilizzare un controllo di qualità interno con controlli nella parte bassa e nella parte alta della curva di taratura, per controllare regolarmente le prestazioni del metodo.

Il kit UNIQ PINP RIA fornisce due controlli: PINP RIA Control 1 & 2. I valori di attesi dei controlli sono riportati sul foglio del controllo di qualità fornito con il kit.

Ogni laboratorio deve stabilire i limiti di accettabilità per i controlli, che non devono differire dai limiti proposti dal produttore del dosaggio. E' opportuno stabilire i limiti per i controlli dosandoli con kit di almeno due lotti diversi.

9. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL TEST

Se usa un metodo computerizzato per l'elaborazione dei dati, scegliere l'interpolazione Spline; è comunque possibile interpolare manualmente i dati usando carta da grafico semilogaritmica.

- **Calcolare** la media delle cpm di calibratori, controlli e campioni.
- **Calcolare** la il rapporto di competizione B/B₀ %:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{cpm calibratore o campione} - \text{NSB}}{\text{cpm calibratore 0} - \text{cpm NSB}} \times 100$$

dove B è la radioattività legata a un campione o a un calibratore, mentre B₀ è la radioattività del calibratore 0 ed NSB è la radioattività di legame non specifico.

- **Disegnare** una curva su carta semilogaritmica con i valori di B/B_0 % in ordinate e le concentrazioni di PINP ($\mu\text{g/L}$) dei calibratori in ascisse.
- **Leggere** le concentrazioni di PINP di controlli e campioni dalla curva di calibrazione.
- **Ogni campione a concentrazione inferiore a quelli del calibratore a più bassa concentrazione deve essere riportato come a concentrazione inferiore alla concentrazione del calibratore.**
- **Ogni campione a concentrazione superiore del calibratore a più alta concentrazione, deve essere diluito e ridosato.** Moltiplicare i risultati ottenuti per il fattore di diluizione utilizzato.

Fig. 1 Esempio di una curva di calibrazione

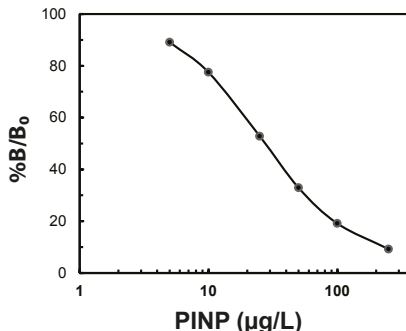


Tabella 1 Esempio di calcolo dei risultati

Provetta	media cpm	cpm-NSB	%B/B ₀	PINP ($\mu\text{g/L}$)
Total	50970			
NSB	845			
Cal 0	28330	27485		
Cal 5.0	25343	24498	89.1	
Cal 10	22143	21289	77.5	
Cal 25	15344	14499	52.8	
Cal 50	9897	9052	32.9	
Cal 100	6095	5250	19.1	
Cal 250	3379	2534	9.2	
Campione 1	10725	9880	35.9	44.6
Campione 2	4572	3727	13.6	157

10. LIMITI DEL METODO

I risultati del dosaggio devono essere usati insieme con altre informazioni cliniche relative al paziente per prendere le decisioni diagnostiche e terapeutiche. Di conseguenza, il kit iNtQi PINP non deve essere utilizzato come screening per rilevare la presenza di osteoporosi nella popolazione generale.

Nel valutare una serie di campioni successivi, raccogliere i campioni alla stessa ora del giorno, poiché esiste una variazione circadiana di PINP con i valori che più elevati di notte. Il collagene di tipo I è sintetizzato anche dai fibroblasti e quindi può essere trovato nel tessuto connettivo insieme ad altri tipi di collagene. Poiché l'osso rappresenta l'organo più ricco di collagene e ha un metabolismo attivo in tutte le fasi della vita, la maggior parte del collagene di tipo I viene quindi sintetizzato dagli osteoblasti.²⁵

Il PINP è metabolizzato nel fegato.²⁶ In caso di malattie epatiche gravi la clearance del PINP può essere alterata con un aumento dei livelli circolanti di PINP.²⁷ Come per la maggior parte dei metodi che utilizzano anticorpi secondari, i campioni con anticorpi eterofili che reagiscono contro le immunoglobuline animali possono causare risultati errati.

11. VALORI DI RIFERIMENTO

Per variazioni dovute alla razza, all'età o alla dieta, i valori di riferimento sopra riportati potrebbero non applicarsi alla popolazione afferente al laboratorio. Ogni laboratorio deve stabilire i propri limiti di riferimento.

Sono stati misurati con il kit di UniQ PINP RIA i livelli di PINP di adulti finlandesi di razza bianca apparentemente in buona salute. E' stato usato il metodo non parametrico suggerito da IFCC per calcolare i limiti di riferimento inferiore e superiore.²⁸ Ogni laboratorio deve stabilire i propri limiti di riferimento.

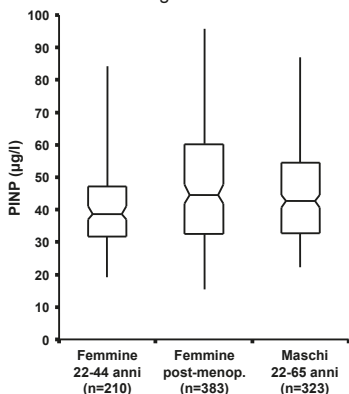
Tabella 2 Valori attesi di PINP nel siero

	Femmine	Femmine Post-menopausa *	Maschi
Età, anni	25-44	52-62	22-65
Numero di soggetti	210	383	323
Media	42 µg/l	48 µg/l	45 µg/l
Mediana	39 µg/l	45 µg/l	43 µg/l
Intervallo di riferimento**	19-83 µg/l	16-96 µg/l	22-87 µg/l
0.95-intervalli di riferimento			
limite inferiore	14-23 µg/l	15-19 µg/l	20-25 µg/l
limite superiore	71-96 µg/l	87-103 µg/l	77-94 µg/l

*Min. 3 anni postmenopausa

**Intervallo di riferimento = 0,025 e 0,975 percentili.

Fig. 2 I diagrammi (box plot) della distribuzione delle concentrazioni di PINP in adulti apparentemente sani. La linea orizzontale in ogni box rappresenta il valore mediano mentre i limiti più bassi e superiori dei box indicano le gamme interquartili cioè, valori 25 % sopra e sotto il valore mediano. Le punte dei baffi mostrano i limiti degli intervalli di riferimento (0.025-0.975 percentile).



I risultati presentati sopra dimostrano che i livelli di PINP in una popolazione di donne in post-menopausa sono più elevati rispetto ai livelli in donne di 25-44 anni ($p = 0.0005$, Mann Whitney). Questo aumento in PINP riflette l'aumento nel rimodellamento osseo associati con bassi livelli di estrogeni in una popolazione di donne in post-menopausa confrontata con una popolazione più giovane. Tuttavia, vi è un notevole sovrapposizione nei livelli di PINP nelle due popolazioni.

STUDI CLINICI

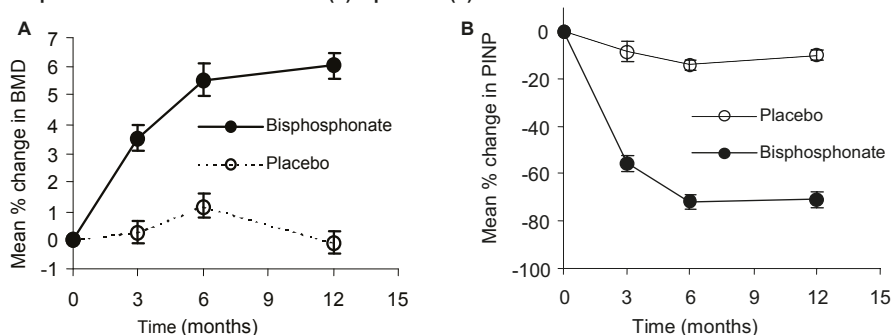
Trattamento con bifosfonato

L'utilità del dosaggio UniQ PINP RIA per la verifica del rimodellamento osseo durante il trattamento con bifosfonato (Alendronato 10 mg/die) è stato valutata negli Stati Uniti in uno studio multicentrico, prospettico, in doppio cieco in donne post-menopausa con osteoporosi accertata e da almeno 5 anni in menopausa.²⁹ I dati sono stati da 124 pazienti ripartite con scelta casuale in due gruppi: 62 che avevano ricevuto il trattamento (TRM) e 62 che avevano ricevuto un placebo (CTR). Tutti i soggetti arruolati nello studio avevano ricevuto un supplemento di calcio di 500 mg/die. Le pazienti sono stati valutate prima del trattamento (valori basali) e a 3, 6 e 12 mesi dall'inizio del trattamento. La densità minerale ossea (BMD) è stata misurata con la densitometria ossea a raggi x a doppia energia (DXA) ed il PINP intatto con il kit UniQ PINP RIA. I dati sono riportati nella tabella 3 e figura 3. Prima del trattamento la BMD era $0,740 \pm 0,083 \text{ g/cm}^2$ (media $\pm$ deviazione standard) per il gruppo CTR e $0,727 \pm 0,104 \text{ g/cm}^2$ per il gruppo TRM. Nel gruppo TRM, la BMD media è aumentata del 6,0 % dai valori basali a 12 mesi. L'incremento della BMD è risultata significativa in tutti i punti rispetto ai valori basali ($p<0.0001$). L'incremento nel gruppo di CTR è risultato inferiore e transitorio con ritorno ai valori basali dopo 12 mesi. Prima del trattamento la concentrazione di PINP era $62,5 \pm 18,5 \text{ }\mu\text{g/L}$ per il gruppo di CTR e $61,1 \pm 30,1 \text{ }\mu\text{g/L}$ per il gruppo TRM. La concentrazione media di PINP nel gruppo TRM ha mostrato una diminuzione del 70,8 % a 12 mesi dall'inizio del trattamento, con un decremento significativo per tutti i punti rispetto ai valori basali ($p<0.0001$). Il decremento nel gruppo CTR, che come il gruppo TRM aveva ricevuto la supplementazione di calcio, è risultato inferiore, pari al 9,8 % a 12 mesi. Le variazioni osservate nella BMD e nei livelli di PINP durante il trattamento con bifosfonati riflettono gli effetti che questo trattamento ha sul rimodellamento osseo. I risultati erano quelli attesi e simili ai risultati dei primi lavori, e, come questi hanno indicato una diminuzione significativa dei livelli di PINP durante il trattamento con bifosfonati.¹¹

Tabella 3 Risposta riportata come media percentuale della variazione di BMD e PINP (SD) in pazienti trattate con bifosfonato o placebo

Test	Gruppi Trattati	Variazione media percentuale (SD) dei valori basali					
		3 mesi		6 mesi		12 mesi	
BMD	Placebo	+0.3	(3.1)	+1.2	(3.3)	-0.1	(3.2)
	Bifosfonato	+3.5	(3.2)	+5.1	(4.4)	+6.0	(3.3)
PINP	Placebo	-8.6	(25.9)	-14.0	(25.5)	-9.8	(27.4)
	Bifosfonato	-55.4	(34.0)	-71.6	(15.6)	-70.8	(15.5)

Fig. 3 Risposta come variazione percentuale media (barre $\pm$ SE) in (A) BMD e (B) concentrazione PINP, in pazienti trattate con bifosfonato (●) o placebo (○).



Per avere significato clinico, la variazione percentuale fra due misure deve superare sia la variazione analitica (Cva) che intra-individuale (CVi). Questa soglia si riferisce alla minima variazione percentuale e può essere calcolata come segue:

$$\text{Minima variazione percentuale} = \sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV_a^2 + CV_i^2)}$$

In altri lavori presenti in letteratura si trovano variazioni diverse per le concentrazioni di PINP, ad esempio, Hannon e co-workers¹² hanno trovato una variazione minima percentuale del 21 %.

Terapia ormonale sostitutiva

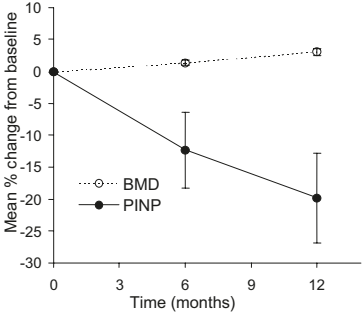
La capacità del dosaggio UniQ PINP RIA di evidenziare i cambiamenti nel rimodellamento osseo durante la terapia ormonale sostitutiva (HRT) in donne in post-menopausa è stato valutato con uno studio in doppio cieco.³²⁻³³ Lo studio è stato eseguito in donne finlandesi in buona salute dopo almeno 3 anni dalla menopausa. I dati sono stati ricavati dal gruppo di 44 soggetti trattate con la dose minima di trattamento: 1 mg/die di estradiolo valerato per os e 2,5 mg/die orale di medrossiprogesterone acetato per os. Le pazienti sono valutate prima del trattamento ed a 6 e 12 mesi dall'inizio del trattamento. La densitometria ossea è stata eseguita con raggi X a doppia-energia (DXA) e le concentrazioni di PINP intatto sono state misurate con il kit UniQ PINP RIA.

I dati sono presentati nella tabella 4 e figura 4. Prima del trattamento la BMD era $1,083 \pm 0,182$ g/cm² (media $\pm$ deviazione standard) e la concentrazione di PINP era $42,2 \pm 15,3$ µg/L. A 6 mesi la BMD era aumentato mediamente del 1,4 % ed a 12 mesi l'aumento era del 3,1 % rispetto al valore basale. Il PINP è diminuito rispetto al valore basale di 12,3 % a 6 mesi e del 19,8 % a 12 mesi. I cambiamenti della BMD e del PINP sono significativi ($p < 0,002$) rispetto al valore basale per entrambi i parametri. Le variazioni osservate nella BMD e nelle concentrazioni di PINP intatto durante la terapia ormonale sostitutiva riflettono l'effetto che questo trattamento ha sul rimodellamento osseo anche con il trattamento a basse dosi valutato in questo studio. I risultati erano quelli attesi e simili ai risultati dei primi lavori, e, come questi hanno indicato una diminuzione significativa dei livelli di PINP durante il trattamento con tipi diversi di terapie ormonali sostitutive.^{12-13, 15}

Tabella 4 Risposta come variazione media percentuale della concentrazione di PINP e della BMD in pazienti in post-menopausa in terapia ormonale sostitutiva a basso dosaggio.

Test	Variazione percentuale media (SD) rispetto ai valori basali	
	6 mesi	12 mesi
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Fig. 4 Risposta come variazione media percentuale (barre $\pm$ SE) della concentrazione di PINP (●) e della BMD (○) in donne in pos-tmenopausa in terapia ormonale sostitutiva a basso dosaggio.



Trattamento con Teriparatide

Il Teriparatide, ormone paratiroideo umano [PTH] 1–34 ricombinante, stimola la formazione dell'osso. La capacità del UniQ PINP RIA di evidenziare le variazioni del rimodellamento osseo durante il trattamento dell'osteoporosi con teriparatide è stata valutata in 19 studi clinici con il metodo randomizzato in doppio cieco.³⁴ I soggetti erano pazienti ambulatoriali in post-menopausa con osteoporosi accertata, dopo almeno 5 anni dalla menopausa. Un sottogruppo dei soggetti ha ricevuto durante lo studio teriparatide 20 µg/die e supplementazione di calcio (1000 mg/die) e vitamina D (400–800 IU/die). Sono stati raccolti i dati in modo retrospettivo di 62 pazienti di età 64,9 $\pm$ 7,8 anni (media $\pm$ deviazione standard) trattate con teriparatide e che valori di PINP e della BMD nei punti di campionamento previsti. E' stato valutato il tratto lombare della colonna vertebrale (L1-L4) misurando la BMD in tutti le pazienti con la densitometria DXA con densitometri a fascio pulsato (Hologic) o densitometri Lunar a livello basale e a 3, 6, 12 e 18 mesi di trattamento con teriparatide. Le concentrazioni di PINP intatto sono state misurate a livello basale e a 3, 6, 12 e 18 mesi di trattamento con teriparatide con il kit UniQ PINP RIA.

La terapia con Teriparatide ha provocato un aumento medio della BMD durante tutto il periodo di studio con incrementi che statisticamente significativi ($p < 0.0001$) per tutto periodo rispetto ai valori basali. L'aumento medio di BMD media è stato di 0,025 g/cm² a 3 mesi, di 0,039 g/cm² a 6 mesi, di 0,061 g/cm² a 12 mesi e di 0,079 g/cm² a 18 mesi.

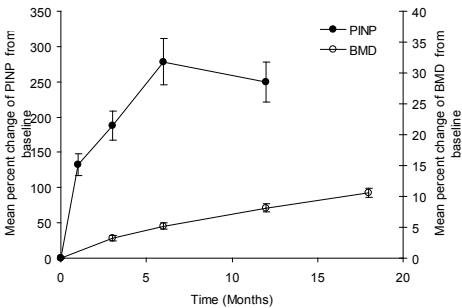
La concentrazione media di PINP è aumentata di 59 µg/L rispetto ai valori basali ad 1 mese, di 82 µg/L a 3 mesi, di 117 µg/L a 6 mesi e di 103 µg/L a 12 mesi. L'aumento della concentrazione di PINP rispetto ai valori basali è statisticamente significativo ($p < 0.0001$) per tutto il periodo studiato.

Sono stati calcolati gli incrementi rispetto ai valori di base per il periodo studiato per BMD e PINP. Le variazioni percentuali medie sono riportate nella tabella 5 e nella figura 5. Si è avuto un incremento di PINP e BMD in risposta alla terapia con teriparatide. Si è verificato un aumento della concentrazione di PINP dopo 6 mesi dall'inizio della terapia, seguito da una lieve diminuzione a 12 mesi. La BMD media è aumentata in risposta al trattamento con un valore massimo che è stato osservato alla conclusione del periodo di studio.

Tabella 5 Variazione media percentuale ($\pm$ SD) nella concentrazione di PINP e di BMD in 62 donne in post-menopausa con osteoporosi in terapia con 20 μ g/die di teriparatide.

Test	Variazione (media $\pm$ SD)	Variazione (media $\pm$ SD)	Variazione (media $\pm$ SD)	Variazione (media $\pm$ SD)	Variazione (media $\pm$ SD)
	1 mese	3 mesi	6 mesi	12 mesi	18 mesi
BMD	NA	3.3 $\pm$ 3.4 %	5.2 $\pm$ 3.8 %	8.1 $\pm$ 5.1 %	10.6 $\pm$ 5.6 %
PINP	132.6 $\pm$ 118.2 %	187.8 $\pm$ 164.2 %	278.5 $\pm$ 257.1 %	249.5 $\pm$ 221.7 %	NA

Fig. 5 Variazione media percentuale (barre $\pm$ SE) della concentrazione di PINP e della BMD in 62 donne in post-menopausa con osteoporosi in terapia con 20 μ g/die di teriparatide.



Le variazioni osservate nella BMD e nei livelli di PINP intatto riflettono l'effetto anabolico della terapia con teriparatide sul rimodellamento dell'osso. Come previsto, i risultati ottenuti sono stati simili a quelli riportati in altri lavori, con incrementi significativi dei livelli di PINP durante il trattamento con teriparatide.¹⁷⁻²⁰ E' stato così istituito un protocollo, parzialmente basato sui risultati di questo studio clinico³⁴, per valutare con la determinazione dei livelli di PINP, l'efficacia della terapia con teriparatide delle pazienti con osteoporosi post-menopausale.²¹

12. PRESTAZIONI CARATTERISTICHE

I risultati forniti di seguito sono stati ottenuti da Aidian e rappresentano i dati tipici.

Linearità

La linearità del test UniQ PINP RIA è stata studiata diluendo i campioni con il calibratore 0 µg/L. Il recupero % è stato calcolato dividendo la concentrazione misurata per la concentrazione prevista e moltiplicando il risultato per 100.

Tabella 6 Linearità del test PINP

Campione	Diluzione	Valore atteso (µg/L)	Valore medio misurato (µg/L, n = 4)	Valore calcolato (µg/L)	Recupero (%)
1	Intero	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			Media	189.3	
			SD	12	
			CV %	6.3	
2	Intero	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			Media	79.9	
			SD	2.4	
			CV %	3	

Precisione

Precisione Intra-saggio e Inter-saggio del test determinata utilizzando un pool di sieri e controlli contenenti concentrazioni diverse di PINP.

Tabella 7 Precisione Intra-saggio / Inter-saggio

Precisione Intra-saggio di 18 o 20 test ripetuti			Precisione Inter-saggio di 10 determinazioni ripetute		
Campione	Media (µg/l)	CV (%)	Campione	Media (µg/l)	CV (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Test di recupero

Il recupero è stato studiato aggiungendo quantità note di PINP purificato ad un campione contenente 19,1 µg/L di PINP endogeno. Il campione è stato dosato due volte con il kit UniQ e sono stati calcolati la concentrazione di PINP ed il recupero %. Il valore del recupero % si calcola con il rapporto tra l'incremento osservato e la quantità di PINP aggiunto moltiplicato per 100.

Tabella 8 Recupero del test PINP

Aggiunto (µg/L)	Misurato (µg/L)	Incremento (µg/L)	Recupero (%)
–	19.1	–	–
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Specificità

Il kit UniQ PINP RIA per la determinazione di PINP intatto è altamente specifico per le forme trimeriche intatte del propeptide N-terminale del procollagene di tipo I. I prodotti monomerici di degradazione a basso peso molecolare del propeptide PINP (Col1) sono rilevati a bassi livelli (cross-reattività 2,7 %). Il kit UniQ PINP RIA non cross reagisce con il propeptide N-terminale del procollagene di tipo III (PIIINP).

Sostanze interferenti

Non provocano interferenze nel dosaggio concentrazioni di bilirubina fino a 400 µmol/L, di emoglobina fino a 5 g/L e di trigliceridi fino a 30 g/L.

Dose minima rilevabile

La dose minima rilevabile di PINP con il kit UniQ PINP RIA è stato determinata misurando 3 volte 20 replicati del calibratore 0 µg/L e della curva di calibrazione (4 replicati). La concentrazione minima rilevabile di PINP è risultata essere < 2 µg/L, definita come due volte la deviazione standard delle cpm del calibratore zero.

Intervallo di misura

L'intervallo di misura per il kit UniQ PINP RIA è 5–250 µg/L.

13. TRACCIABILITÀ

L'analita presente nel kit UniQ PINP RIA è tracciabile rispetto ai calibratori di riferimento del produttore, preparati da PINP altamente purificato con valore assegnato con l'analisi della composizione aminoacidica.

14. SMALTIMENTO

- Smaltire il prodotto in conformità alla regolamentazione nazionale e locale.
- Tutti i campioni dei pazienti, le cuvette e le provette per il campionamento usate devono essere maneggiati e smaltiti come materiali potenzialmente infetti.
- I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti in conformità alle leggi applicabili.
- Materiali dei componenti:
 - Carta: istruzioni per l'uso
 - Cartone: scatola del kit
 - Plastica: bottiglia del reagente di separazione, tappi dei flaconi
 - Gomma: Tappi
 - Vetro: fiale del tracciante, dell'antisiero, del calibratore e del controllo
 - Gommapiuma
- I reagenti forniti, se utilizzati conformemente alle norme della Buona Pratica di Laboratorio, nonché nel rispetto delle norme igieniche e delle istruzioni per l'uso, non dovrebbero presentare rischi per la salute.

UniQ® PINP RIA

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

1. URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

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

2. SOUHRN A VÝKLAD

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

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

Během kostní formace je kostní matrice produkována před tím, než se objeví mineralizace, proto je PINP časným markerem kostní formace. Kostní alkalická fosfatáza, buněčný membránový enzym přítomný v preosteoblastech a osteoblastech, je dalším časným markerem osteoblastické aktivity.² Osteokalcin je pozdější marker osteoblastické diferenciace, který se objevuje ve fázi mineralizace kosti.³

Kostní tkáň je značně metabolicky aktivní a během celého života dochází ke stálé remodelaci. Remodelace kosti se dosahuje dvěma protichůdnými ději: kostní formací a kostní resorpcí, které jsou za normálních podmínek spolu úzce svázány. Nemoci kostního metabolismu jsou charakteristické nerovnováhou kostního obratu a často dochází k nepochopitelnosti mezi kostní formací a kostní resorpcí.⁴ Indikátory obratu kolagenu typu I, jako je PINP, jsou velmi užitečné k vyšetřování skeletální remodelace za normálních i abnormálních podmínek. Test UniQ PINP RIA poskytuje citlivý nástroj k hodnocení zvýšeného kostního obratu u postmenopauzálních žen⁵⁻⁹ a může být částečně úspěšným nástrojem pro monitorování vlivu anti-resorpční a anabolické terapie na kostní metabolismus¹⁰⁻²¹. Stanovení PINP bylo použito i k detekci zvýšené změny aktivity kolagenu typu I u onemocnění jako je např. Pagetova kostní choroba²²⁻²⁴

3. PRINCIP TESTU

Test UniQ PINP RIA je založen na technice kompetitivní radioimunoanalýzy. Znamé množství značeného PINP a neznámé množství neznačeného PINP soutěží o omezený počet vysoce afinitních vazebných míst polyklonální králíčí protilátky proti PINP. K separaci PINP navázaného na protilátku a volného PINP se používá sekundární protilátka proti králíčímu IgG navázaná na kaolinové částice. Radioaktivita navázaného značeného antigenu (radioindikátoru) je měřena na gamma-čítači. Množství značeného PINP ve zkumavce se vzorkem je nepřímo úměrné množství

PINP ve vzorku. Koncentrace PINP v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky, která se testuje souběžně pomocí UniQ PINP RIA kalibrátorů obsahujících od 0 do 250 µl/l PINP.

4. REAGENCIE

UniQ® PINP RIA, kat. č. 67034

Název a původ složky	Použité symboly	 100	Stabilita při 2...8°C	
			Neotevřené	Otevřené
Radioindikátor	Ag ¹²⁵ I	22 ml Radioaktivita < 200 kBq	Do data expirace vyznačeného na štítku	6 týdnů
Antisérum ORIG RAB	Ab	22 ml	Do data expirace vyznačeného na štítku	6 týdnů
Kalibrátor	CAL xx µg/l	7 x 0.5 ml	Do data expirace vyznačeného na štítku	6 týdnů
Kontrola ORIG HUM	CONTROL #	2 x 1.0 ml	Do data expirace vyznačeného na štítku	6 týdnů po rekonstituci
Prokolagenová separační reagentie	REAG SEPAR	60 ml	Do data expirace vyznačeného na štítku	6 týdnů
Návod k použití				

Reagentie obsahují azid sodný – přečtěte si část 5 "Upozornění a varování".

Příprava reagentií

Kontroly jsou lyofilizované. Všechny ostatní reagentie jsou připravené k použití.

Lahvičky s kontrolou ještě před jejich otevřením vytemperujte na pokojovou teplotu (18...25°C). Kontroly rekonstituuje přidavkem 1,0 ml destilované nebo deionizované vody do každé lahvičky. Zavřete víčko a důkladně promíchejte jemným kroužením nebo převrácením, zamezte přitom tvorbě pěny. Před použitím nechte stát 30 minut.

Zhoršení stavu reagentií

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

5. UPOZORNĚNÍ A VAROVÁNÍ

Údaje o zdraví a bezpečnosti

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Nepipetujte ústy.
- Se všemi vzorky pacientů a kontrolami je nutné zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Kontrolní materiál obsahuje složky lidského původu, které byly testovány a shledány negativními na protilátky

proti viru lidské imunodeficiency (HIV 1 a 2), viru hepatitidy C (HCV) a na povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg). Přesto s kontrolami zacházejte jako s materiálem potenciálně infekčním.

- Lyofilizované reagentie obsahují < 1 % azidu sodného (Aquatic Chronic 3). Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky (H412). Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami (EUH032). Zabraňte uvolnění do životního prostředí (P273). Odstraňte obsah podle národních a místních zákonů (P501). Reakci azidů s kovovým potrubím mohou vznikat výbušné sloučeniny. Riziko nahromadění azidu v odpadním potrubí při likvidaci reagentií zabraňte tak, že odpad spláchnete velkým množstvím vody.
- Rekonstituované a tekuté reagentie obsahují < 0,1 % azidu sodného. Tato koncentrace není považována za škodlivou.
- Tato souprava obsahuje ¹²⁵I (poločas $T_{1/2}$ 60 dnů) emitující 35,5 keV gama záření a 27–32 keV rentgenového záření. Radioaktivní materiál obsažený v této soupravě mohou přijímat, přechovávat a používat pouze lékaři, klinické laboratoře, výzkumné ústavy nebo nemocnice a mohou být používány pouze pro klinické testy nebo laboratorní testování in vitro, které nezahrnuje interní ani externí podávání materiálu nebo radiace z něj pramenící k ozařování lidí nebo zvířat. Veškeré radioaktivní materiály skladujte a manipulujte s nimi jen na místech k tomu určených. Prodej, skladování, používání nebo manipulace s radioaktivním materiálem podléhá zákonům v zemi uživatele.
- Zamezte styku s kůží a očima. Při styku s kůží místo okamžitě omyjte velkým množstvím vody a dekontaminujte dle příslušných nařízení pro likvidaci nehodou ukápnutých materiálů.
- Ukápnutý radioaktivní materiál je nutno okamžitě setřít detergentem a kontaminované čistící materiály umístit do sběrné nádoby pro radioaktivní odpad nebo likvidovat podle doporučení Státního úřadu pro jadernou bezpečnost.
- Radioaktivní materiál, určený do odpadu, musí být likvidován v souladu s platnými právními předpisy v daném státě. Prostudujte si předpisy pro jadernou bezpečnost a nařízení příslušného úřadu pro manipulaci, uskladnění a likvidaci radioaktivních materiálů.

Analytická bezpečnostní opatření

- Nepoužívejte produkt po uplynutí doby expirace uvedené na vnějším obalu.
- Nepřekračujte dobu, po kterou je zaručena stabilita pro otevřené reagentie.
- Nemíchejte komponenty z různých šarží nebo různých testů.

6. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU

Před odběrem vzorku není nutná žádná speciální příprava pacienta.

Používejte sérum, asepticky odeberte venózní krev za dodržení běžných bezpečnostních opatření. Test neprovádějte se vzorky plazmy.

Nepoužívejte vzorky pacientů, které jsou vysoce lipemické, hemolyzované nebo mikrobiálně kontaminované.

Manipulace se vzorkem; skladování vzorku

Po odběru vzorku nechte krev srazit a separujte sérum centrifugací. Vzorky sér se mohou skladovat až 5 dnů při teplotě 2...8°C. Delší dobu skladujte při teplotě –20°C a méně. Je třeba se vyhnout opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorku. Vzorky s vysokou koncentrací PINP mohou být ředěny fyziologickým roztokem.

7. PRACOVNÍ POSTUP

Seznam reagensií – viz. sekce 4 Reagencie.

Potřebný materiál, který není součástí soupravy:

- Mikropipety (pro přesné dávkování 50 µl, 200 µl, 500 µl a 1000 µl)
- Testovací zkuševky (z polystyrenu, např. 12 x 75 mm)
- Buničitá vata
- Krycí folie parafilm
- Vibrační míchadlo
- Vodní lázeň (s teplotou 37±1°C)
- Dekantovací stojánek
- Centrifuga (s odstředivou silou nejméně 2000 g nejlépe chlazená)
- Gama-čítač
- Destilovaná nebo deionizovaná voda

Přístroje

K měření lze použít jakýkoliv gama-čítač schopný měření ¹²⁵I. Účinnost měření by měla být pravidelně kontrolována, stejně tak i proměřováno pozadí. Doporučuje se systematická kalibrace přístroje. Podrobnosti týkající se zapojení, použití, údržby a kalibrace najdete v návodu k obsluze dodávaném výrobcem přístroje.

Podrobný popis postupu

1	Před použitím vytemperujte všechny reagenty a vzorky na laboratorní teplotu (18...25°C). Všechny reagenty před použitím dobře promíchejte jemným převracením.
2	Označte polystyrenové zkuševky v duplikátech pro nespecifickou vazbu (NSB), kalibrátory, kontroly, pacientské vzorky a zkuševky pro celkovou aktivitu.
3	Napipetujte do každé zkuševky 50 µl kalibrátoru, kontrolního a pacientského vzorku. Do zkuševky pro stanovení nespecifické vazby (NSB) lze pipetovat jakýkoliv pacientský vzorek nebo kalibrátor 0 µg/l.
4	Do všech zkuševky přidejte 200 µl radioindikátoru (červený).
5	Do všech zkuševky kromě NSB a celkové aktivity napipetujte 200 µl roztoku antiséra (modrý). Do zkuševky určených pro stanovení NSB přidejte 200 µl destilované nebo deionizované vody.
6	Obsah všech zkuševky důkladně promíchejte na vibračním míchadle, zkuševky přikryjte fólií a inkubujte 2 hodiny při 37±1°C.
7	Prokologenové separační činidlo nejprve důkladně promíchejte šetrným převracením lahvičky dnem vzhůru a přidejte po 500 µl do všech zkuševky kromě zkuševky pro celkovou aktivitu.
8	Obsah zkuševky důkladně promíchejte (na vibračním míchadle) a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě (18...25°C).
9	Centrifugujte všechny zkuševky kromě zkuševky pro celkovou aktivitu 15 minut při 2000 g při teplotě v rozmezí 4...20°C (doporučovaná teplota je 4°C).
10	Obsah všech zkuševky, vyjma zkuševky pro celkovou aktivitu, dekantujte. Jemně klepněte zkuševkami do buničité vaty a ponechte několik vteřin odkapat, aby se odstranil i poslední zbytek kapaliny. Dejte pozor, aby nedošlo k dekantaci sraženiny. Zkuševky jednou otočené nazpět již znovu dnem vzhůru neotáčejte. Pokud ve zkuševkách zůstanou zbytky kapaliny, způsobí to rozptýl v hodnotách replikátů a chybné hodnoty.

11	Změřte radioaktivitu všech zkumavek pomocí gamma-čítače po dobu 1 minuty.
12	Vypočítejte výsledky podle postupu uvedeného v části "Výpočet výsledků".

Souhrn pracovního postupu

(všechny objemy jsou v µl)

	Celková aktivita	NSB	Kalibrátor	Kontroly a neznámé vzorky
Napipetujte vzorek		50	50	50
Napipetujte radioindikátor (červený)	200	200	200	200
Napipetujte antisérum (modré)			200	200
Napipetujte destilovanou/deionizovanou vodu		200		
Míchejte		x	x	x
Inkubujte 2 hodiny při 37°C		x	x	x
Napipetujte separační reagentii		500	500	500
Míchejte		x	x	x
Inkubujte 30 min. při laboratorní teplotě (18...25°C)		x	x	x
Centrifugujte 15 minut při 2000 g		x	x	x
Dekantujte		x	x	x
Měřte 1 min	x	x	x	x

8. KONTROLA KVALITY

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

9. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTU

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

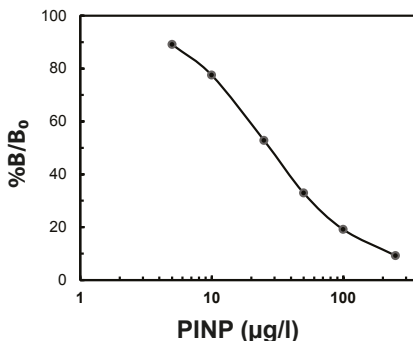
- **Vypočtete** střední hodnotu impulsů pro všechny kalibrátory, vzorky, kontroly a nespécifickou vazbu.
- **Vypočtete** % (B/B₀) podle vzorce:

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

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

- **Vyneste** kalibrační křivku na semilogaritmický papír z hodnot % (B/B₀) na ose **y** a odpovídajících koncentrací PINP (µg/l) kalibrátorů na ose **x**.
- **Stanovte** koncentrace PINP v neznámých vzorcích odečtením z kalibrační křivky.
- **Pokud** je u vzorku stanovena hodnota nižší než je hodnota nejnižšího kalibrátoru, měla by být nahlášena hodnota ve stanovené výši.
- **Každý vzorek se stanovenou hodnotou vyšší, než je hodnota nejvyššího kalibrátoru, musí být naředěn a znovu stanoven.** Po naředění musí být hodnoty opraveny použitím ředícího faktoru.

Obr. 1 Typická kalibrační křivka.
Tato kalibrační křivka je pouze orientační.



Tabulka 1 Výpočet výsledků při použití typických údajů.
Tato data jsou pouze orientační a nesmí být použita pro výpočet jakýchkoli výsledků vzorků.

Zkumavka	Průměr cpm	cpm-NSB	%B/B ₀	PINP (µg/l)
Celková aktivita	50970			
NSB	845			
Cal 0	28330	27485		
Cal 5.0	25343	24498	89.1	
Cal 10	22143	21289	77.5	
Cal 25	15344	14499	52.8	
Cal 50	9897	9052	32.9	
Cal 100	6095	5250	19.1	
Cal 250	3379	2534	9.2	
Nezn. vz. 1	10725	9880	35.9	44.6
Nezn. vz. 2	4572	3727	13.6	157

10. OMEZENÍ PRACOVNÍHO POSTUPU

Výsledky, získané touto soupravou, musí být při stanovení diagnózy a dalšího léčebného postupu použity pouze ve spojitosti s ostatními relevantními klinickými informacemi. Proto se souprava UniQ PINP RIA nedoporučuje pro použití při screeningu k detekci osteoporózy u obecné populace.

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

Kolagen typu I je také syntetizován fibroplasty a proto může být nalezen v řídkých pojivových tkáních spolu s ostatními typy kolagenu. Protože je však kost hlavní kolagenový orgán a je v průběhu života metabolicky aktivní, většina cirkulujícího PINP má původ v osteoblastech²⁶.

PINP je metabolizován v játrech²⁶. Vážné onemocnění jater může ovlivnit jejich pročišťovací schopnost a způsobit tak zvýšené sérové hodnoty PINP.²⁷

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

11. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Z důvodu etnické, dietní a věkové různorodosti nemusí tyto referenční meze odpovídat celé populaci. Rozsahy sledování, uvedené níže, jsou pouze orientační, a neodpovídají nutně rozsahům, které budou pozorovány v dané oblasti. Soupravou UniQ PINP RIA byly stanoveny hodnoty sérových hladin PINP u zjevně zdravých dospělých Finů bílé pleti. K výpočtu referenčních intervalů pro dolní a horní meze bylo použito neparametrické metody doporučené IFCC.²⁸ Každá laboratoř by si měla stanovit své vlastní rozmezí očekávaných hodnot pro místní populaci.

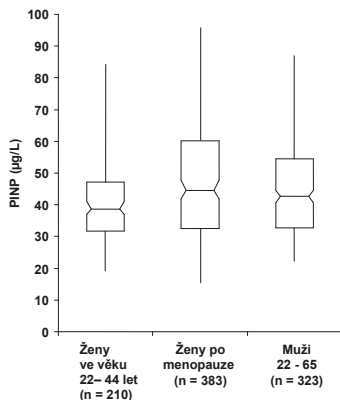
Tabulka 2 Referenční hodnoty koncentrací PINP v séru

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

* Min. 3 roky po menopauze

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

Obrázek 2 Grafické znázornění rozdělení koncentrací PINP u zdravých dospělých jedinců. Horizontální linie v každém rámečku představuje hodnotu mediánu, zatímco spodní a horní meze rámečků představují interkvartilní rozsahy, t.j. hodnoty 25% nad a pod hodnotou mediánu. Konce čar představují meze referenčního rozsahu (fraktály 0,025 a 0,975).



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

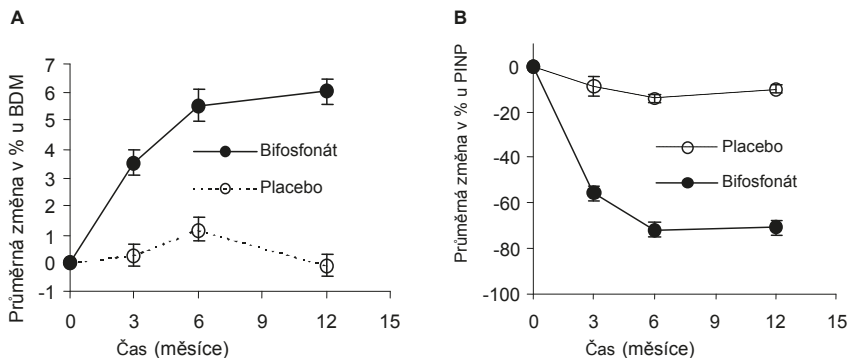
Léčba bisfosfonáty

Prospěšnost soupravy UniQ PINP RIA ke sledování změn remodelace kosti v průběhu léčby bisfosfonáty (denně 10 mg alendronátu) byla studována multicentrickou, prospektivní studií, dvojitě zaslepenou s placebem na populaci postmenopauzálních žen z různých míst v USA, u kterých byla diagnostikována osteoporóza, a které byly alespoň 5 let po menopauze.²⁹ Data byla získána od 124 pacientek náhodně rozdělených do dvou skupin: 62 bylo léčeno (TRM) a 62 dostávalo placebo (CTR). Všechny studované subjekty dostávaly denně suplementaci vápníkem 500 mg/d. Pacientky byly analyzovány na počátku a po 3, 6 a 12 měsících léčení. Minerální hustota kosti (BMD) byla měřena rentgenovou absorpcí (DXA) a intaktní PINP byl měřen soupravou UniQ PINP RIA. Získaná data jsou uvedena v tabulce 3 a na obrázku 3. Na počátku sledování byla BMD 0.740±0.083 g/cm² (průměr ± SD) u skupiny CTR a 0.727±0.104 g/cm² u skupiny TRM. U skupiny TRM za 12 měsíců průměrná BMD vzrostla o 6.0% ze základní hodnoty. Změna byla významná ve všech sledovaných časových obdobích ve srovnání se základní hodnotou (p < 0.0001). Vzrůst u skupiny CTR byl za 12 měsíců menší a přechodně se vracel na základní hodnotu. Základní koncentrace PINP byla 62.5±18.5 µg/l u skupiny CTR a 61.1±30.1 µg/l u skupiny TRM. Průměrná koncentrace PINP u skupiny TRM poklesla o 70.8% za 12 měsíců léčby. Pokles byl významný u všech tří časových bodů ve srovnání se základní hodnotou (p < 0.0001). Pokles u skupiny CTR, která také dostávala vápníkový doplněk, byl menší a dosáhl za 12 měsíců 9.8%. Pozorované změny BMP a PINP v průběhu léčby bisfosfonáty odrážejí vliv, který má tato léčba na remodelaci kostí. Výsledky byly podle očekávání a podobné dřívějším pozorováním, která ukazovala značný pokles hladin PINP během léčby bisfosfonáty.^{11, 30–31}

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

Test	Léčená skupina	Průměrná procentuální změna oproti výchozí hodnotě		
		3 měsíce	6 měsíců	12 měsíců
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	−0.1 (3.2)
	Bisfosfonát	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	−8.6 (25.9)	−14.0 (25.5)	−9.8 (27.4)
	Bisfosfonát	−55.4 (34.0)	−71.6 (15.6)	−70.8 (15.5)

Obrázek 3 Odezva jako průměrné procento změny (úsečky $\pm$ SE) (A) BDM a (B) koncentrace PINP u pacientek užívajících bisfosfonát (●) nebo placebo (○).



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

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

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

Hormonální substituční léčba

Schopnost soupravy UniQ PINP RIA reagovat na změny při remodelaci kostí v průběhu hormonální substituční léčby (HRT) u žen po menopauze byla sledována ve studii zkoumající optimální dávkování³²⁻³³. Studované subjekty byly zjevně zdravé finské ženy alespoň tři roky po menopauze. K dispozici byla data od 44 žen, léčených po zlomenině paže, které dostávaly nejnižší léčebné dávky: denně orálně 1 mg valerátu estradiolu a orálně 2,5 mg acetátu medroxyprogesteronu. Pacientky byly analyzovány na počátku léčení a po 6 a 12 měsících. BMD byla měřena rentgenovou absorpcí (DXA) a intaktní PINP byl měřen soupravou UniQ PINP RIA.

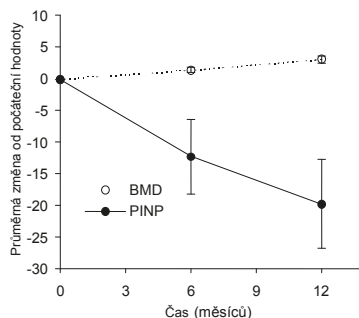
Data jsou uvedena v tabulce 4 a na obrázku 4. Na počátku byla hodnota BMD 1.083 ± 0.182 g/cm² (průměr $\pm$ SD) a koncentrace PINP 42.2 ± 15.3 µg/l. Za 6 měsíců BMD vzrostla průměrně o 1,4 % a za 12 měsíců byl pozorován vzrůst o 3,1% od počáteční hodnoty. PINP poklesl za 6 měsíců o 12,3% od základní hodnoty a za 12 měsíců o 19,8%. Změny BMD a PINP byly významné ($p < 0.002$) jak po 6, tak po 12 měsících ve srovnání s hodnotou při započetí léčby.

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

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

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

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



Léčba teriparatidem

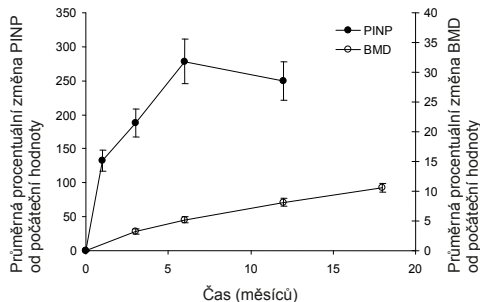
Teriparatid, rekombinantní lidský parathormon [PTH] (resp. část jeho řetězce 1–34) stimuluje tvorbu kosti. Schopnost testu UniQ PINP RIA reflektovat změny v kostní remodelaci po podání teriparatidu v léčbě osteoporózy byla studována na 19 klinických pracovištích ve studii s randomizovaným, dvojitě slepým uspořádáním.³⁴ Studie se zúčastnily ambulantně léčené postmenopauzální ženy s diagnostikovanou osteoporózou minimálně pět let po menopauze. Podskupina pacientek užívala po celou dobu studie 20 μ g teriparatidu v dávce jednou denně s každodenní suplementací kalcia (1000 mg) a vitamínu D (400–800 IU). Data byla sebrána od 62 pacientek ve věku 64.9 ± 7.8 let (průměr $\pm$ SD) užívajících teriparatid, pro které byla k dispozici úplná sada výsledků BMD a PINP v plánovaných časových bodech odběru. BMD lumbální páteře (L1–L4) byla měřena u všech pacientek pomocí DXA za použití denzitometru Lunar nebo Hologic na počátku studie (baseline) a po 3, 6, 12 a 18 měsících léčby teriparatidem. Koncentrace intaktního PINP byla měřena na počátku studie a po 1, 3, 6 a 12 měsících léčby pomocí testu UniQ PINP RIA. Léčba teriparatidem vedla k nárůstu průměrných hodnot BMD během celé studie, přičemž tento nárůst byl statisticky signifikantní ve všech časových bodech ($p < 0.0001$) v porovnání s počátečním stavem (baseline). Průměrná hodnota BMD se zvýšila o 0,025 g/cm² po 3 měsících, o 0,039 g/cm² po 6 měsících, o 0,061 g/cm² po 12 měsících a o 0,079 g/cm² po 18 měsících.

Průměrná koncentrace PINP se v porovnání s počáteční (baseline) hodnotou zvýšila o 59 µg/l po 1 měsíci, o 82 µg/l po 3 měsících, o 117 µg/l po 6 měsících a o 103 µg/l po 12 měsících. Nárůst koncentrace PINP v porovnání s počátečním stavem (baseline) byl statisticky signifikantní ve všech časových bodech ($p < 0,0001$). V každém časovém bodě byla vypočítána procentuální změna v porovnání s počáteční hodnotou pro BMD a PINP. Průměrné procentuální změny jsou uvedeny v tabulce 5 a graficky znázorněny na obrázku 5. Průměrné hodnoty pro PINP a BMD se zvýšily v reakci na léčbu teriparatidem. Koncentrace PINP dosáhla vrcholu po 6 měsících a byla následována mírným poklesem po 12 měsících v porovnání s hodnotou po 6 měsících. Průměrná hodnota BMD se zvýšila v reakci na léčbu, a maximální hodnota byla pozorována na konci studijní periody.

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

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

Obrázek 5 Odpověď jako průměrná procentuální změna (± SE) BMD a koncentrace PINP u 62 postmeno-
pauzálních žen s osteoporózou užívajících teriparatid v dávce 20 µg jednou denně.



Změny pozorované u BMD a koncentrace intaktního PINP odrážejí anabolický účinek terapie teriparatidem na kostní remodelaci. Tyto výsledky byly očekávány a podobají se výsledkům v jiných popisech, které prokázaly signifikantní zvýšení hladin PINP během léčby teriparatidem.^{17–20} Částečně na základě stejných klinických materiálů jako ve výše uvedené studii³⁴ byl vyvinut algoritmus pro použití PINP k monitorování pacientů léčených teriparatidem, který podtrhuje klinickou vhodnost měření PINP pro léčbu postmenopauzální osteoporózy.²¹

12. ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

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

Linearita

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

Tabulka 6 Linearita PINP testu

Vzorek	Ředění	Očekávaná koncentrace (µg/l)	Průběh měření (µg/l, n=4)	Přepočet pro neředěné (µg/l)	Fáze vzestupu (%)
1	neředěný	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			Průměr SD CV %	189.3 12 6.3	
2	neředěný	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			Průměr SD CV %	79.9 2.4 3	

Přesnost

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

Tabulka 7 Opakovatelnost / Reprodukovatelnost

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

Fáze vzestupu

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

Tabulka 8 Metoda standardního přidavku (recovery)

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

Specifická

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

Interferující látky

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

Mez detekce

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

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

Měřicí rozsah

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

13. NÁVAZNOST

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

14. LIKVIDACE

- Odstraňte obsah podle národních a místních zákonů.
- Všechny vzorky pacientů a kontroly je nutné považovat za potenciálně infekční materiál a podle toho je nutné s nimi zacházet a likvidovat je.
- Radioaktivní materiál, určený do odpadu, musí být likvidován v souladu s platnými právními předpisy v daném státě.
- Materiály komponentů:
 - Papír: Návod k použití
 - Karton: Obal soupravy
 - Plast: Lahvička od separační reagentie, víčka lahvíček
 - Pryž: Zátka
 - Sklo: Lahvičky od radioindikátoru, antiséra, kalibátorů a kontrol
 - Pěnová guma
- Jestliže jsou dodávané reagentie používány podle zásad správné laboratorní praxe, dobré pracovní hygieny a podle instrukcí v tomto návodu k použití, neměly by představovat zdravotní riziko.

UniQ® PINP RIA

Zestaw radioimmunologiczny do oznaczania całkowitego N-końcowego propeptydu prokolagenu typu I

1. PRZEZNACZENIE

Zestaw UniQ PINP RIA jest przeznaczony do oznaczania *in vitro* ilościowego stężenia N-końcowego propeptydu prokolagenu typu I, jako wskaźnika aktywności osteoblastów w surowicy krwi. Test ten jest pomocny w rozpoznaniu osteoporozy postmenopauzalnej. Zastosowano tu technikę radioimmunometryczną. **Do badań *in vitro*.**

2. PODSUMOWANIE I OBJAŚNIENIA

Kolagen typu I jest najczęściej spotykanym kolagenem w organizmie oraz jedynym kolagenem, jaki znaleźć można w warstwie mineralnej kości. Jego synteza przeprowadzana jest przez fibroblasty i osteoblasty. Kolagen typu I stanowi 90% masy organicznej kości. Kości mają największe stężenie kolagenu oraz wysoką aktywność metaboliczną przez całe życie. W osteoblastach kości syntetyzowana jest większość włókien kolagenu typu I.

Kolagen kostny jest pochodną większego białka, prokolagenu typu I. Prokolagen typu I składa się z łańcuchów trój-aminokwasowych. Są one splecione tworząc formę potrójnego heliku.

Oba końce cząsteczki kolagenu typu I są wydłużone przez reszty propeptydowe. Przed połączeniem się cząsteczek we włókna kolagenowe, końcowe propeptydy są odcinane przez specyficzne proteiny. Obie propeptydy pojawiają się w krwiobiegu, zaś ich stężenie odzwierciedla natężenie produkcji kolagenu typu I.

Zestaw UniQ PINP RIA służy do pomiaru stężenia aminokońcowego propeptydu prokolagenu typu I (PINP)¹ w surowicy. Ponieważ stężenie to jest wprost proporcjonalne do ilości nowego kolagenu odkładanego w kościach, badanie to może zostać wykorzystane w ocenie tworzenia kości.

Podczas procesu tworzenia kości, najpierw tworzona jest macierz kostna, a następnie zachodzi proces mineralizacji kości. PINP można uznać za wczesny marker w procesie tworzenia kości. Kostna fosfataza alkaliczna, enzym błony komórkowej obecny w preosteoblastach i osteoblastach, jest kolejnym wczesnym markerem aktywności osteoblastów.² Osteokalcyna jest późniejszym markerem różnicowania się osteoblastów, który pojawia się na etapie mineralizacji kości.³

Tkanka kostna jest niezwykle aktywna metabolicznie i w ciągu życia jest stale przebudowywana. Na przebudowę kości składają się dwa przeciwstawne procesy: tworzenie się kości i resorpcja kości, które w normalnych warunkach fizjologicznych, są ściśle powiązane. Choroby metaboliczne kości charakteryzują się brakiem równowagi w bilansie obrotu kostnego i powodują nierównowagę między procesem tworzenia się kości i resorpcji kostnej.⁴

Synteza kolagenu typu I może podlegać zmianom w czasie patogenezy wielu rodzajów chorób. Jednakże, ponieważ kość jest głównym organem kolagenowym, aktywnym przez całe życie, oznaczanie obrotu kolagenu typu I jest najbardziej przydatne badaniem przy ocenie metabolicznych chorób kości.

U kobiet post-menopauzalnych oznaczanie PINP pozwala wykryć zwiększony obrót kostny i w konsekwencji, ocenić stopień ryzyka złamania⁵⁻⁹ oraz służy do monitorowania wyników terapii antyresorpcyjnej w metabolizmie kości¹⁰⁻²¹. Zestaw intact UNIQ PINP pozwala na oznaczenie zwiększonego obrotu kostnego kolagenu typu I w chorobie kości

Pageta.²²⁻²⁴

3. ZASADY TESTU

Zestaw UNIQ PINP RIA opiera się na technice kompetycyjnej, radioimmunologicznej. PINP (nieznakowany) z próbki badanej oraz PINP znakowany (¹²⁵I–PINP) konkurują o ograniczoną ilość miejsc wiążących na poliklonalnym króliczym przeciwciele anti-PINP. Drugie przeciwciało opłaszczone na cząsteczkach kaolinu, skierowane przeciwko przeciwciału króliczemu. Przeciwciało to pozwala na rozdzielenie kompleksu [PINP-przeciało anti-królik] od wolnych cząsteczek PINP. Po wypłukaniu próbówki z antygenu niezwiązanego ilość znakowanego antygenu (¹²⁵I–PINP) w próbówce testowej jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia antygenu (PINP) w próbce badanej. Stężenie PINP w próbkach badanych oblicza się z krzywej wzorcowej. Stężenie PINP we wzorcach użytych w zestawie UniQ PINP RIA w zakresie 0 do 250 µg/l zostało potwierdzone testem zgodności.

4. ODCZYNNIKI

UniQ® PINP RIA, Nr kat 67034

Nazwa składnika i pochodzenie	Używane symbole	Σ100	Stabilność w temp. 2...8°C	
			Zamknięte	Otwarte
Znacznik	Ag125I	22 ml Radioaktywność < 200 kBq	Do końca daty ważności podanej na etykiecie	6 tygodni
Przeciwciało ORIGRAB	Ab	22 ml	Do końca daty ważności podanej na etykiecie	6 tygodni
Wzorce	CALxxµg/l	7 x 0.5 ml	Do końca daty ważności podanej na etykiecie	6 tygodni
Surowice kontrolne ORIGHUM	CONTROL#	2 x 1.0 ml	Do końca daty ważności podanej na etykiecie	6 tygodni po rozpuszczeniu
Odczynnik separujący Prokolagen	REAGSEPAR	60 ml	Do końca daty ważności podanej na etykiecie	6 tygodni
Instrukcja użycia				

Odczynniki zawierają azcydek sodu, zob. część 5 "Ostrzeżenia i środki ostrożności".

Przygotowanie odczynnika

Kontrolę są poddane liofilizacji. Wszystkie pozostałe odczynniki są gotowe do użycia. Doprowadzić fiołki do ogrzania w temperaturze pokojowej (18...25°C), przed ich otwarciem. Rozpuścić surowice kontrolne dodając po 1 ml wody destylowanej lub dejonizowanej do każdej fiołki. Zakorkować i dokładnie wymieszać poprzez delikatne potrząsanie lub odwracanie fiołki. Unikać spienienia. Pozostawić na 30 minut przed użyciem.

Zła jakość odczynnika

Składniki zestawu, których wygląd budzi wątpliwości odbiorcy, różnice w nachyleniu krzywej wzorcowej lub też wartości surowic kontrolnych odbiegające od zakresu wyznaczonego przez producenta, mogą wskazywać na nies-tabilność odczynników. Nie należy korzystać z odczynników, jeśli podejrzewa się ich rozkład.

5. UWAGI I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Informacje dotyczące zdrowia i bezpieczeństwa

- Wyłącznie do użytku w diagnostyce *in vitro*.
- Nie pipetować ustami.
- Wszystkie próbki pacjentów i kontrole należy traktować jak materiał potencjalnie zakaźny.
- Materiał kontrolny zawiera materiał pochodzenia ludzkiego, który został przetestowany z wynikiem negatywnym na obecność przeciwciał przeciwko wirusowi HIV 1 i 2, HCV oraz HbsAg. W ramach środków ostrożności z materiałem kontrolnym należy pracować jak z materiałem zdolnym do przenoszenia agensu infekcyjnego.
- Odczynnik iofilizowane zawierają <1% azydru sodu (Aquatic Chronic 3). Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki (H412). W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy (EUH032). Unikać uwolnienia do środowiska (P273). Zawartość usuwać zgodnie z przepisami krajowymi i lokalnymi (P501). Azydki mogą reagować z metalem w rurach kanalizacyjnych, tworząc wybuchowe związki. Tworzeniu azydru można przeciwdziałać, splukując wylewane odczynniki dużą ilością wody.
- Odczynnik rekonstituowany i płynne zawierają <0,1 azydru. Takie stężenie nie jest uważane za szkodliwe.
- Zestaw zawiera ¹²⁵I (okres półtrwania T_{1/2} równy 60 dni) emitujący promieniowanie gamma 35,5 keV oraz promieniowanie rentgenowskie 27–32 keV. Materiał radioaktywny zawarty w tym zestawie może być odbierany, przyswimiany, posiadany i stosowany wyłącznie przez lekarzy, laboratoria kliniczne, instytucje badań i szpitale oraz stosowany wyłącznie do klinicznych badań lub testów laboratoryjnych *in vitro*, które nie obejmują wewnętrznego lub zewnętrznego podawania materiału lub napromieniania ludzi lub zwierząt. Wszystkie materiały radioaktywne powinny być przechowywane i przetwarzane wyłącznie w specjalnie wyznaczonych miejscach. Zakup, przechowywanie, stosowanie lub wymiana produktów radioaktywnych jest regulowane przepisami prawa obowiązującymi w kraju użytkownika.
- Unikać kontaktu ze skórą i oczami. W przypadku kontaktu ze skórą należy ją natychmiast przemyć dużą ilością wody oraz odkazić zgodnie z przepisami dotyczącymi usuwania przypadkowego rozlania płynu.
- Rozlany materiał radioaktywny musi być natychmiast usunięty za pomocą detergentu, a skażone materiały do czyszczenia umieszczone do pojemników przeznaczonych do odpadów radioaktywnych lub zlikwidowane zgodnie z zaleceniami Państwowego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Jądrowego.
- Materiały radioaktywne przeznaczone do wyrzucenia muszą być utylizowane zgodnie z obowiązującym prawem w danym kraju. Należy zapoznać się z przepisami dot. bezpieczeństwa jądrowego oraz rozporządzenia danego kraju o postępowaniu, składowaniu i utylizacji materiałów radioaktywnych.

Środki ostrożności dotyczące procedur analitycznych

- Nie używać produktu po upływie daty ważności zaznaczonej na opakowaniu zewnętrznym.
- Nie przekraczać okresu, w którym jest zapewniona stabilność otwartego odczynnika.
- Nie mieszać składników o różnych numerach serii lub z różnych testów.

6. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Przed pobraniem próbek nie jest konieczne specjalne przygotowanie pacjenta. W celu uzyskania próbki surowicy od pacjenta należy posłużyć się dostępną metodą medyczną. Pobrać krew żylną. Należy przy tym przestrzegać podstawowych zasad pobierania krwi żyłnej. Do badań nie używać próbek osocza.

Nie używać próbek pacjentów, które są wysoce lipemiczne, zhemolizowane lub mikrobiologicznie zanieczyszczone.

Przygotowanie i przechowywanie próbek

Próbkę krwi po pobraniu należy pozostawić do momentu wytracenia się skrzepu lub odwirować. Próbkę mogą być przechowywane do 5 dni w temperaturze 2–8°C. Przy przechowywaniu przez dłuższy okres czasu próbki należy zamrozić w temperaturze przynajmniej –20°C. Należy unikać powtórznego zamrażania i rozmrażania próbek. Próbkę z podwyższonym stężeniem PINP można rozcieńczać solą fizjologiczną (0.9% roztwór NaCl).

7. PROCEDURA ANALITYCZNA

Utylizacja: patrz rozdział 4 "Materiały", lista odczynników.

Potrzebne materiały nieuwzględnione w zestawie

- Pipety (zapewniające precyzyjne dozowanie 50 µl, 200 µl, 500 µl i 1000 µl)
- Probówki (polistyrenowe, np. 12 x 7.5 mm)
- Lignina lub bibuła
- Parafilm
- Mieszadło (Vortex)
- Łaźnia wodna (temp. 37±1°C)
- Statyw dekantacyjny
- Wirówka (osiągająca co najmniej 2000 g Zalecana z opcją chłodzenia)
- Licznik gamma
- Woda destylowana lub dejonizowana

Aparatura

Pomiary można przeprowadzać dowolnym licznikiem promieniowania gamma, przeznaczonym do pomiarów izotopu jodu ¹²⁵I. Należy regularnie sprawdzać wydajność i granice błędu licznika, podobnie jak promieniowanie tła. Zaleca się systematyczną kalibrację urządzenia. Podczas instalacji, obsługi, naprawy oraz kalibracji licznika należy postępować zgodnie z instrukcją obsługi urządzenia.

Szczegółowa procedura

1	Doprowadzić wszystkie odczynniki i próbki do temperatury pokojowej na co najmniej 30 minut przed użyciem. Wymieszać poprzez delikatne odwracanie fiolek.
2	Oznakować polistyrenowe probówki w dubletach dla NSB (próba ślepa), wzorców, kontroli, próbek i pomiarów TOTAL.
3	Wpipetować 50 µl wzorców, kontroli lub próbek pacjentów do odpowiednich probówek. Dowolna próbka od pacjenta lub wzorec 0 µg/l mogą zostać wpipetowane do probówek NSB.
4	Wpipetować 200 µl znacznika (kolor czerwony) do wszystkich probówek.
5	Wpipetować 200 µl przeciwciała (kolor niebieski) do wszystkich probówek poza NSB i TOTAL. Wpipetować 200 µl wody destylowanej lub dejonizowanej do probówek NSB.
6	Wymieszać wszystkie probówki na vortexie, zakryć parafilmem i inkubować przez 2 godziny w temperaturze 37±1°C.
7	Wymieszać dokładnie odczynnik separujący prokolagen delikatnie odwracając fiolkę i dodać po 500 µl do wszystkich probówek, poza TOTAL.
8	Wymieszać wszystkie probówki na vortexie i inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej.
9	Wirować wszystkie probówki (poza TOTAL) w wirówce przy minimum 2000 g, w temperaturze 4–20°C (zaleca się 4°C), przez 15 minut.

10	Zekantować supernatant z próbek (poza TOTAL) i wytrząsnąć resztki płynu uderzając górą próbek o bibułę. Pozostawić próbki odwrócone na kilka sekund w celu lepszego usunięcia płynu. Należy uważać, aby nie zdekantować osadu. Nie odwracać ponownie próbek po ich odstawieniu. Nieudana dekantacja lub przesuszenie próbek może być przyczyną słabej powtarzalności lub nieprawidłowych wyników.
11	Zmierzyć wszystkie próbki przy pomocy licznika gamma przez co najmniej 1 minutę.
12	Sposób obliczania wyników opisano w rozdziale "Obliczanie wyników".

Zawartość zestawu

Streszczenie procedury (wszystkie objętości w µl)

	Total	NSB	Wzorzec	Kontrola i próbka badana
Wpipetować próbki		50	50	50
Wpipetować znacznik (czerwony)	200	200	200	200
Wpipetować przeciwciało (niebieski)			200	200
Wpipetować wodę destylowaną / dejoniz.		200		
Wymieszać		x	x	x
Inkubować 2 godz/37°C		x	x	x
Wpipetować odczynnik separujący		500	500	500
Wymieszać		x	x	x
Inkubować 30 min/TP		x	x	x
Wirować 15 min/2000 g		x	x	x
Zdekantować		x	x	x
Zliczać przez 1 minutę lub do 10000 zliczeń	x	x	x	x

8. KONTROLA JAKOŚCI

W związku z prowadzonym w laboratoriach klinicznych programem zapewnienia jakości należy stosować surowice kontrolne w zakresie wartości niskich i wysokich w stosunku do zakresu referencyjnego. Ten sposób zapewnienia monitorowania wydajności procedury.

W zestawie UniQ PINP RIA znajdują się dwie surowice kontrolne: PINP PIA Controls 1 i 2. Wartości oczekiwane są podane na osobnej ulotce dołączonej do zestawu.

Zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło we własnym zakresie, wartości graniczne dla stosowanych kontroli. Wartość średnia kontroli powinna mieścić się w przedziale tolerancji podawanym przez producenta. Wyznaczenie własnego zakresu dla surowic kontrolnych powinno zostać przeprowadzone w przynajmniej dwóch seriach. Po ustaleniu zakresów kontrolnych, należy przeprowadzić kontrole w duplikatach dla każdego badania.

9. OBLICZANIE WYNIKÓW

Jeżeli stosuje się licznik automatyczny, zalecanym sposobem wyznaczania krzywej wzorcowej jest funkcja SPLINE. Jeżeli krzywą wzorcową rysuje się ręcznie to należy ją przedstawiać na papierze półlogarytmicznym.

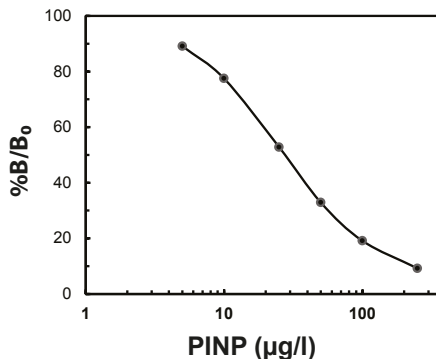
- **Obliczyć** średnią ilość zliczeń dla wszystkich wzorców, próbek i kontroli i próbki ślepej NBS.
- **Obliczyć** $\%B/B_0$ ze wzoru:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{zliczenia dla wzorców lub próbek} - \text{NSB}}{0 - \text{zliczenia dla wzorców} - \text{NSB}} \times 100$$

gdzie: B jest to radioaktywność próbki badanej lub wzorca, B_0 jest to radioaktywność wzorca 0, a NBS to radioaktywność próbki ślepej.

- **Naszkicować** krzywą wzorcową na papierze półlogarytmicznym z wartościami $\%B/B_0$ na rzędnej (oś-Y) i wartościami stężenia PINP ($\mu\text{g/l}$) wzorców na odciętej (oś-X).
- **Odczytać** wartości stężenia PINP w próbkach badanych z krzywej wzorcowej.
- **Każdy wynik odczytany poniżej najmniejszego wzorca powinien być podany jako wartość tego wzorca.**
- **Każda próbka, której wynik odczytano powyżej największego wzorca powinna zostać rozcieńczona.** Następnie próbkę taką należy ponownie zmierzyć. Przy podawaniu wyniku takiej próbki należy uwzględnić krotność rozcieńczenia tzn. pomnożyć uzyskany wynik przez tę krotność.

Rys. 1 Przykładowa krzywa wzorcowca.



Tab. 2 Obliczenie wyników na podstawie przykładowych danych.

Danych tych nie należy używać do obliczania własnych wyników testu.

Próbówka	średnia cpm	Cpm-NSB	$\%B/B_0$	PINP ($\mu\text{g/l}$)
Total	50970			
NSB	845			
Wz. 0	28330	27485		
Wz. 5	25343	24498	89.1	
Wz. 10	22143	21289	77.5	
Wz. 10	15344	14499	52.8	
Wz. 50	9897	9052	32.9	
Wz. 100	6095	5250	19.1	
Wz. 250	3379	2534	9.2	
Próbka bad. 1	10725	9880	35.9	44.6
Próbka bad. 2	4572	3727	13.6	157

10. OGRANICZENIA PROCEDURY

Wartości PINP ulegają zmianom w zależności od pory dnia. Najwyższe obserwuje się w nocy. Wyniki PINP, które miałyby stanowić podstawę dla celów diagnostycznych i/lub terapeutycznych muszą być poparte innymi odpowiednimi danymi klinicznymi.

Kolagen typu I wytwarzany jest również przez fibroblasty i z tego powodu znajduje się w tkance łącznej, wraz z innymi typami kolagenów.

Kości mają największe stężenie kolagenu oraz wysoką aktywność metaboliczną przez całe życie. W osteoblastach kości syntetyzowana jest większość włókien kolagenu typu I. Większość PINP w krwiobiegu pochodzi z osteoblastów.²⁵ PINP jest metabolizowany w wątrobie.²⁶ Ciężkie schorzenia wątroby mogą zaburzać klirens w krążeniu i prowadzić do wzrostu stężenia PINP w surowicy.²⁷

W zestawach, gdzie zastosowano drugie przeciwciało (tu: przeciwciało IgG królik/koza) może dochodzić do reakcji z przeciwciałami (np.: przeciwciało heterofilowe) z próbki badanej. Może to być przyczyną nieprawidłowych wyników.

11. SPOSÓB WYZNACZENIA LIMITÓW

Ze względu na różnice etniczne, żywieniowe i wiekowe, podane wyznaczenie limitów może nie dotyczyć wszystkich populacji. Poniżej podane zakresy są wyłącznie normami przykładowymi. Dlatego też zaleca się wyznaczenie własnych zakresów referencyjnych w każdym laboratorium. Za pomocą zestawu UniQ PINP RIA zmierzono poziom PINP u zdrowych osób dorosłych z populacji fińskiej. Następnie obliczono przedziały referencji dla górnych i dolnych granic za pomocą bezparametrowej metody zalecanej przez IFCC²⁸. Każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości oczekiwanych dla miejscowej ludności.

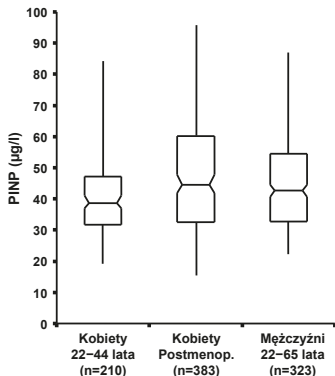
Tabela 2 Przykładowe zakresy norm PINP w surowicy

	Kobiety	Kobiety w wieku postmenopauzalnym*	Mężczyźni
Wiek, lata	25–44	52–62	22–65
Ilość badanych	210	383	323
Średnia	42 µg/l	48 µg/l	45 µg/l
Mediana	39 µg/l	45 µg/l	43 µg/l
Zakres normy**	19–83 µg/l	16–96 µg/l	22–87 µg/l
Przedziały ufności 0.95			
dla dolnej granicy normy	14–23 µg/l	15–19 µg/l	20–25 µg/l
dla górnej granicy normy	71–96 µg/l	87–103 µg/l	77–94 µg/l

* Min. 3 lata postmenopauzy

**Przedział referencyjny = 0.025 & 0.975

Rys. 2 Wykresy skrzynkowe z wąsami (Box-Whisker) oznaczające rozmieszczenie stężenia PINP u osób zdrowych, dorosłych. Pozioma linia w każdej skrzynce oznacza wartość mediany, podczas gdy górna i dolna granica każdej skrzynki oznacza zakresy interkwartyli, tzn. wartości 25% powyżej i poniżej mediany. Wąsy (Whiskers) rozciągają się od wartości minimalnej do maksymalnej tej zmiennej, (fraktyłe 0.025 i 0.0975).



Wyniki przedstawione na powyższym wykresie wskazują, że stężenie PINP w populacji kobiet post-menopauzalnych jest większe w stosunku do stężenia zmierzonego u kobiet w wieku 25–44 lata ($p=0.0005$, Mann Whitney). Wzrost stężenia PINP w populacji kobiet post-menopauzalnych w porównaniu z populacją kobiet młodszych, jest wynikiem zwiększonej przebudowy kostnej związanej z niedoborem estrogenów. Jednakże dla obu populacji stężenie PINP w znacznym zakresie normy pokrywa się.

BADANIA KLINICZNE

Leczenie bisfosfonianami

Testowano przydatność zestawu UniQ PINP RIA do monitorowania zmian zachodzących podczas przebudowy kości podczas leczenia bisfosfonatelnego (10 mg alendronatu dziennie). Testy te prowadzono w warunkach: wielomiejscowo, prospektywnie, z podwójnym placebo u kobiet po menopauzie w Stanach Zjednoczonych, u których stwierdzono osteoporozę w co najmniej 5 lat po menopauzie.²⁹ Dane pochodzące od 124 pacjentek podzielono na dwie grupy: 62 leczonych (TRM) i 62 otrzymujących placebo (CTR). Wszystkie osoby badane otrzymywały 500mg/d wapnia. Od pacjentek pobierano próbki do badań w następujących okresach po: 3, 6 i 12 miesiącach. Gęstość mineralna kości (BMD) badano metodą absorptometrii rentgenowskiej o podwójnej energii promieni X (DXA), zaś stężenie całkowitego PINP badano używając zestawu UniQ PINP RIA.

Dane przedstawiono w tabeli 3 i na rysunku 3. Wartość linii bazowej – BMD, to $0.740 \pm 0.083 \text{ g/cm}^2$ (średnia $\pm$ odchylenie standardowe) u CTR, oraz $0.727 \pm 0.104 \text{ g/cm}^2$ u TRN. W grupie TRM średnia wartość BMD wzrosła o 6% (w stosunku do linii bazowej) po 12 miesiącach. Zmiana była zauważalna w każdym momencie leczenia w porównaniu z wartością bazową ($p < 0.0001$). Wzrost u grupy CTR był mniejszy i krótkotrwały – wracał do wartości bazowej po 12 miesiącach.

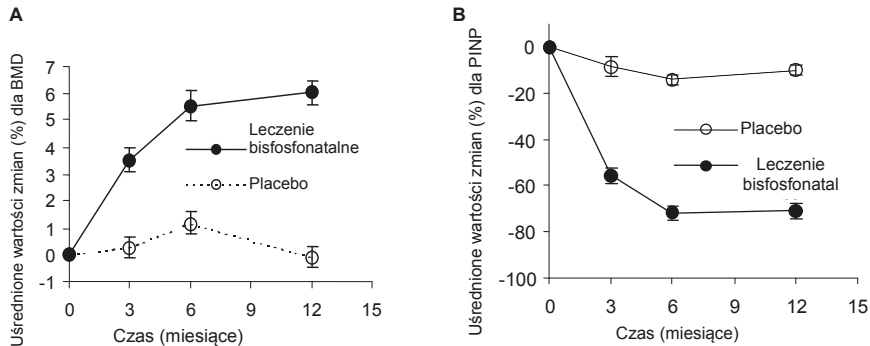
Przy tak ustalonej linii bazowej, stężenie PINP wynosiło $62.5 \pm 18.5 \mu\text{g/l}$ w grupie CTR i $61.1 \pm 30.1 \mu\text{g/l}$ w grupie TRM. Średnie stężenie PINP w grupie TRM wzrosło o 70.8% po 12 miesiącach leczenia. Podczas każdej analizy zmniejszenie było znaczne ($p < 0.0001$) w porównaniu z wartością bazową. Spadek stężenia w grupie CTR otrzymującej suplementację wapniową, był mniejszy (9.8%) po 12 miesiącach.

Zmiany w BMD i PINP zaobserwowane podczas leczenia bisfosfonatального odzwierciedlają skutki, jakie leczenie to wywiera na proces przebudowy kości. Wyniki były takie, jak się spodziewano i podobne do wcześniejszych doniesień, w których wykazano znaczne obniżenie poziomu PINP podczas leczenia bisfosfonatального.^{11,30–31}

Tabela 3 Uśrednione wartości zmian (%) dla BMD i PINP u pacjentek poddanych leczeniu bifosfonatalnemu oraz u grupy placebo.

Badanie	Grupa pacjentów	Średnia wartość (w %) zmiany (SD) od linii bazowej		
		3 miesiące	6 miesięcy	12 miesięcy
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	-0.1 (3.2)
	Leczenie bisfosfonatalne	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	-8.6 (25.9)	-14.0 (25.5)	-9.8 (27.4)
	Leczenie bisfosfonatalne	-55.4 (34.0)	-71.6 (15.6)	-70.8 (15.5)

Rys. 3 Uśrednione wartości zmian (%) (± SE wykres słupkowy) dla BDM na wykresie A i dla stężenia PINP na wykresie B u pacjentek poddanych leczeniu bifosfonatalnemu (•) oraz u grupy placebo (○).



W celu określenia znaczenia klinicznego, procentowa zmiana pomiędzy dwoma pomiarami musi przekraczać obie wariancje: analityczną (CVa) i wewnątrz osobniczą (CVi). Granica ta określana jest jako minimum zmiany procentowej i obliczana jest w następujący sposób:

$$\text{Minimum zmiany procentowej} = \sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV^2 + CV_a^2)}$$

W kilkunastu publikacjach podano takie wartości dla PINP, np.: Hannon i wsp.12 określili minimum zmiany procentowej dla PINP jako 21%.

Hormonalna terapia zastępcza (HTZ)

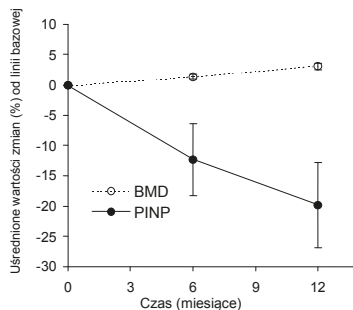
Stosując zestaw UniQ PINP RIA śledzono zmiany w przebudowie kości podczas hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) u kobiet post-menopauzalnych. W badaniu stosowano następujące kryteria: dobór losowy, podwójną próbę ślepą oraz używano dawki optymalnej (dose finding study).^{32–33} Badane osoby to zdrowe fińskie kobiety będące najmniej 3 lata po menopauzie. Uzyskano wyniki od 44 pacjentek otrzymujących najniższą dawkę leków: 1 mg doustnego walerianu estradiolu i 2.5 mg doustnego octanu medroksyprogesteronu dziennie. Linia bazowa BDM u pacjentek była określana na początku leczenia oraz po 6 i 12 miesiącach. BMD zbadano metodą absorpcjometrii rentgenowskiej o podwójnej energii promieni-X, zaś stężenie całkowitego PINP badano stosując zestaw UniQTM PINP RIA. Dane przedstawiono w Tabeli 4 i na Rysunku 4. Wartość linii bazowej BMD wynosiła 1.083 ± 0.182 g/cm² (średnia $\pm$ SD), a stężenie PINP wynosiło 42.2 ± 15.3 µg/l. Po 6 miesiącach wartość BMD wzrosła o średnio o 1.4%, a po 12 miesiącach o 3.1% w stosunku do wartości bazowej. Wartość PINP zmniejszyła o 12.3% po 6 miesiącach i o 19.8% po 12 miesiącach (wartości mierzone w stosunku do wartości bazowej). Zmiany dla wartości BMD i PINP były znaczące ($p < 0.002$) podczas obu analiz, w porównaniu z wartością bazową.

Zmiany zaobserwowane w BMD i stężeniu całkowitego PINP podczas HTZ odzwierciedlają wpływ tego leczenia na proces przebudowy kości, nawet przy stosowaniu niskich dawek leków. Otrzymane wyniki, były zgodne z przewidywanymi oraz zbliżone do wcześniejszych doniesień, z których wszystkie wykazywały znaczne obniżenie stężenia PINP w czasie hormonalnej terapii zastępczej.^{12–13, 15}

Tabela 4 Średnia wartość (w %) zmiany (SD) od linii bazowej

Badanie	Średnia wartość zmiany procentowej (SD) od wartości bazowej	
	6 miesięcy	12 miesięcy
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Rys. 4 Wyniki jako średnia zmiana procentowa ($\pm$ SD) dla stężeń BMD (o) i PINP (*) u kobiet post-menopauzalnych poddawanych hormonalnej terapii zastępczej przy zastosowaniu niskich dawek leków.



Leczenie preparatem teriparatide

Teriparatide, ludzki hormon przytarczyc [PTH] 1–34 uzyskiwany drogą rekombinacji DNA stymuluje tworzenie kości. Zdolność UniQ PINP RIA do odzwierciedlania zmian w przebudowie kości po terapii preparatem teriparatide w leczeniu osteoporozy badano w 19 ośrodkach klinicznych przy użyciu metody randomizacji z podwójną ślepą próbą.³⁴ Osobami badanymi były kobiety, leczone ambulatoryjnie ze zdiagnozowaną osteoporozą, co najmniej 5 lat po menopauzie. Podgrupa pacjentek otrzymywała dawki teriparatide 20 µg dziennie z codziennym uzupełnianiem wapnia (1000 mg) i witaminy D (400–800 j.m.) przez cały okres badania. Zbierano retrospektywne dane 62 pacjentek w wieku 64,9 ± 7,8 lat (średnia ± SD) otrzymujących teriparatide i posiadających pełen zestaw wyników BMD i PINP z wyznaczonych punktów czasowych. Badano BMD odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L1–L4) u wszystkich pacjentek metodą DXA przy użyciu densytometru Lunarowego i Hologicznego przed badaniem i po 3, 6, 12 i 18 miesiącach leczenia preparatem teriparatide. Mierzono stężenie nieuszkodzonego PINP przed badaniem oraz po 1, 3, 6 i 12 miesiącach leczenia przy użyciu testu UniQ™ PINP RIA.

Terapia preparatem teriparatide powodowała wzrost średniego BMD w całym okresie badania, przy czym wzrost był istotny statystycznie we wszystkich punktach czasowych ($p < 0,0001$) w porównaniu z kresem sprzed leczenia. Średnia BMD wzrosła o 0,025 g/cm² po 3 miesiącach, 0,039 g/cm² po 6 miesiącach, 0,061 g/cm² po 12 miesiącach i 0,079 g/cm² po 18 miesiącach.

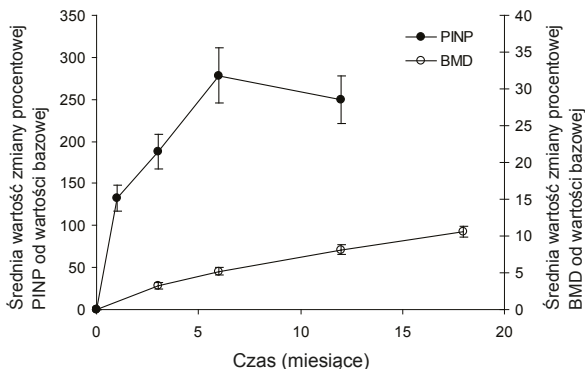
Średnie stężenie PINP wzrosło o 59 µg/l w porównaniu z wartością sprzed leczenia po 1 miesiącu, 82 µg/l po 3 miesiącach, 117 µg/l po 6 miesiącach i 103 µg/l po 12 miesiącach. Wzrost stężenia PINP w porównaniu z wartością sprzed leczenia był istotny statystycznie we wszystkich punktach czasowych ($p < 0,0001$).

Zmiany procentowe w porównaniu z wartościami sprzed leczenia obliczano dla wszystkich punktów czasowych. Średnie zmiany procentowe podano w tabeli 5 i graficznie na rysunku 5. Średnie wartości PINP i BMD wzrastały w odpowiedzi na leczenie preparatem teriparatide. Stężenie PINP osiągnęło szczytową wartość po 6 miesiącach, następnie nieznacznie spadało po 12 miesiącach w porównaniu z punktem czasowym 6 miesięcy. Średnia BMD wzrosła w odpowiedzi na leczenie, przy czym na końcu okresu leczenia obserwowano wartość maksymalną.

Tabela 5 Odpowiedź wyrażona jako procentowa zmiana w BMD (µSD) i stężenia PINP u 62 kobiet po menopauzie z osteoporozą, które otrzymywały dawki teriparatide. 20 µg dziennie.

Test	Zmiana (średnia ± SD)	Zmiana (średnia ± SD)	Zmiana (średnia ± SD)	Zmiana (średnia ± SD)	Zmiana (średnia ± SD)
	1 miesiąc	3 miesiące	6 miesięcy	12 miesięcy	18 miesięcy
BMD	NA	3.3 ± 3.4 %	5.2 ± 3.8 %	8.1 ± 5.1 %	10.6 ± 5.6 %
PINP	132.6 ± 118.2 %	187.8 ± 164.2 %	278.5 ± 257.1 %	249.5 ± 221.7 %	NA

Rys. 5 Odpowiedź wyrażona jako wartość zmiany procentowej ($\pm$ SD) BMD oraz stężenie PINP dla 62 kobiet po menopauzie z osteoporozą, przyjmujących 20 μ g teriparatydu podawanych raz na dobę.



Zmiany obserwowane w zakresie BMD i poziomów nieuszkodzonego PINP odzwierciedlają wpływ anaboliczny terapii preparatem teriparatide na przebudowę kości. Te wyniki były zgodne z oczekiwanymi i podobne do wyników uzyskanych w innych raportach, które wykazywały znaczące podwyższenie poziomu PINP w czasie leczenia preparatem teriparatide^{17–20}. Częściowo w oparciu o ten sam materiał kliniczny, który wykorzystano w niniejszym badaniu³⁴ opracowano algorytm stosowania PINP do monitorowania pacjentek leczonych preparatem teriparatide, co podkreśla kliniczną przydatność badania PINP w leczeniu osteoporozy pomenopauzalnej.²¹

12. CHARAKTERYSTYKA ZESTAWU

Wyniki przedstawione poniżej uzyskano stosując zestaw firmy Aidian i reprezentują one jedynie dane przykładowe.

Liniowość

Liniowość zestawu UniQ PINP RIA badano rozcieńczając próbki przy pomocy wzorca 0 µg/l pochodzącego z zestawu. % odzysku obliczono dzieląc zmierzoną wartość stężenia przez wartość oczekiwaną i mnożąc wynik przez 100.

Tabela 6 Liniowość oznaczenia PINP

Próbka	Rozcieńczenie	Wartość oczekiwana (µg/l)	Wartość zmierzona (µg/l, n = 4)	Wartość obliczona bez rozcieńczania (µg/l)	Odzysk (%)
1	Neat	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			średnia	189.3	
			SD	12	
			CV %	6.3	
2	Neat	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			średnia	79.9	
			SD	2.4	
			CV %	3	

Dokładność

Zgodność wewnątrz- i między seryjną i je zmienność wyznaczono badając "pool'e" próbek surowic pacjentów oraz surowic kontrolnych składających się z próbek o różnych stężeniach PINP.

Tabela 7 Zgodność wewnątrz / między seryjną

Zgodność wewnątrzseryjna dla 18 / 20 powtórzeń			Zgodność międzyseryjna oceniana w 10 dubletach		
Próbka	Średnia (µg/l)	CV (%)	Próbka	Średnia (µg/l)	CV (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Odzysk

Odzysk badano dodając znaną ilość oczyszczzonego antygenu PINP do próbki zawierającej 19,1 µg/l endogennego PINP. Próbkę zmierzono w dublecie przy użyciu zestawu UniQ PINP, wynik odzysku wyrażono w %. % odzysku równa się wzrostowi stężenia podzielonego przez skok stężenia i pomnożonego przez 100.

Tabela 8 Metoda dodatku wzorca (recovery)

Skok (µg/l)	Wartość zmierzona (µg/l)	Wzrost (µg/l)	Odzysk (%)
–	19.1	–	–
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Specyficzność

Zestaw intact UniQ PINP RIA jest wysoce specyficzny do całkowitej formy trymetrycznej N-końcowego propeptydu kolagenu typu I. Produkty degradacji (cząsteczki) o małej masie cząsteczkowej, pochodzące z propeptydu PINP (Col 1) można wykrywać już przy niskich stężeniach (reakcja krzyżowa 2,7%). UniQ PINP RIA nie reaguje krzyżowo z N-końowym propeptydem prokolagenu typu III (PIIINP).

Substancje interferujące

Bilirubina w surowicy o stężeniach < 400 µmol/l (< 23 mg/dl) nie interferuje. Hemoglobina do stężenia 5 g/l (500 mg/dl) nie interferuje. Trójglicerydy do stężenia 30 g/l (3000 mg/dL) nie interferują.

Granica wykrywalności

Granica wykrywalności zestawu dla UniQ PINP RIA ustalono przez czterokrotny pomiar 20 powtórzeń wzorca 0 i 3-krotny odczyt z krzywej wzorcowej (4 powtórzenia). Około 2 µg/l, określona jako dwukrotne odchylenie standardowe wartości wzorca zero.

Zakres pomiarów

Zakres pomiarowy dla zestawu UniQ PINP RIA wynosi 5–250 µg/l.

13. WŁAŚCIWOŚCI ZNACZNIKA

Wzorce do zestawu kalibrowano wobec roboczego macierzystego zestawu wzorców, które przygotowano z wysoko oczyszczonego PINP. Wartość wzorców ustalono metodą analizy składu aminokwasów.

14. UTYLIZACJA

- Zawartość usuwać zgodnie z przepisami krajowymi i lokalnymi.
- Wszystkie próbki pacjenta, używane kufelki i próbówki do próbek należy traktować i usuwać w sposób odpowiedni dla materiału potencjalnie zakaźnego.
- Materiały radioaktywne przeznaczone do unieszkodliwienia muszą być utylizowane zgodnie z obowiązującym prawem w danym kraju.
- Materiały składników:
 - Papier: Instrukcje użycia
 - Karton: Opakowanie zestawu
 - Plastik: fiolka po odczynniku separującym, wieczka fiolek
 - Wyroby gumowe: korki
 - Szkło: fiołki po radioznacznikach, przeciwciałach, kalibratorze oraz kontroli
 - Guma piankowa
- Jeśli dostarczone odczynniki stosuje się zgodnie z Dobrą Praktyką Laboratoryjną (GLP), właściwą higieną pracy oraz niniejszą instrukcją użycia, nie powinny one stanowić zagrożenia dla zdrowia.

UniQ® PINP RIA

Intakt N-terminal propeptid av typ I prokollagen, Radioimmunanalys kit

1. AVSEDD ANVÄNDNING

UniQ PINP RIA är en kvantitativ radioimmunanalys avsedd för bestämning av intakt aminoterminal propeptid av typ I prokollagen, en indikator på osteoblastisk aktivitet, i humant serum. Testen är avsedd att användas som ett hjälpmedel vid behandling v postmenopausal osteopores. **Enbart för *in vitro* diagnostik.**

2. SUMMERING OCH FÖRKLARING

Typ I kollagen, som syntetiseras av fibroblaster och osteoblaster, är den rikligast förekommande kollagentypen i kroppen och den enda kollagentyp som förekommer i mineraliserat ben, där den utgör mer än 90 % av organisk vävnad.

Då ben är det organ med mest kollagen och som är metaboliskt aktivt genom hela livet, kommer ursprungligen majoriteten av syntetiserat typ 1 kollagen från benosteoblaster.

Typ I kollagen bildas från ett större protein, typ I prokollagen som består av tre aminosyrekedjor som är sammanflätade till en spiral. Typ 1 kollagenet har pro-peptidbildningar i båda ändarna av molekylen som spjälkas av specifika proteinaser innan kollagenmolekylerna sammankopplas till kollagenfibrer.

Båda propeptiderna kan påvisas i blodcirkulationen, där deras koncentration i princip avspeglar synteshastigheten av typ I kollagen. UniQ PINP RIA testen mäter serumkoncentrationen av den aminoterminala propeptiden av typ 1 prokollagen (PINP).¹ Då koncentrationen av denna propeptid är direkt proportionerlig till mängden nytt kollagen som lagrats in i ben, kan det användas för att uppskatta benformation.

Vid benformation produceras benmatrix före mineralisering uppkommer; följaktligen blir PINP en tidig markör för benformation. Alkaliska fosfataser från ben, ett enzym från cellmembran som återfinns i preosteoblaster och osteoblaster är en annan markör för osteoblastisk aktivitet.² Osteokalcin är en osteoblast markör för det senare stadiet av benformation, för mineraliseringsfasen.³

Benvävnad är anmärkningsvärt metaboliskt aktivt och genomgår under hela livet konstant omformering. Det uppnås genom två motverkande processer: benformation och bennedbrytning som under normala förutsättningar är tätt knutna till varandra. Metaboliska bensjukdomar karakteriseras av obalans i benomsättningen och leder ofta till en störning i mellan formation och nedbrytning.⁴ En indikator som typ 1 kollagen omsättning, som t ex PINP, är mycket användbar för att undersöka skeletal omformering under normala och onormala villkor. UniQ PINP testen är en känslig markör för att fastsätta ökad benomsättning hos postmenopausala kvinnor⁵⁻⁹ och kan var särskilt användbar för att mäta effekten av anti-resorptiv och anabolisk terapi för benmetabolism.¹⁰⁻²¹ Mätning av PINP används också för att upptäcka ökning av typ 1 kollagen omsättning vid sjukdomar som Paget's bensjukdom.²²⁻²⁴

3. ANALYSPRINCIP

UniQ PINP RIA test är baserad på kompetitiv radioimmunanalysprincip. En känd mängd av märkt PINP och en okänd mängd av omärkt PINP i provet tävlar om ett begränsat antal specifika inbindningsplatser på den polyklonala kanin anti-PINP antikroppen. En andra antikropp, riktad mot kanin IgG och coatad med kaolin partiklar, används för att separera det antikroppsbundna PINP från fritt PINP. Radioaktiviteten från bundet tracer antigen mäts i en

gammarräknare. Efter att ha tvättat bort det obundna antigenet, är mängden märkt PINP i provröret omvänt proportionellt mot mängden PINP i provet. Koncentrationen i ökända prover fås ur en kalibreringskurva som baseras på de samtidigt analyserade UniQ PINP RIA kalibratorerna som innehåller 0 till 250 µg/L PINP.

4. REAGENS

UniQ® PINP RIA, Cat. No. 67034

Namn och ursprung	Symbol	 100	Hållbarhet vid 2...8°C	
			Öppnad	Öppnad
Tracer	Ag ¹²⁵ I	22 mL Radioaktivitet < 200 kBq	till utgångsdatum Se etikett	6 veckor
Antiserum ORIG RAB	Ab	22 mL	till utgångsdatum Se etikett	6 veckor
Kalibrator	CAL xxµg/I	7 x 0.5 mL	till utgångsdatum Se etikett	6 veckor
Kontroll ORIG HUM	CONTROL #	2 x 1.0 mL	till utgångsdatum Se etikett	6 veckor efter uppspädning
Prokollagen Separation Reagens	REAG SEPAR	60 mL	till utgångsdatum Se etikett	6 veckor
Bruksanvisning				

Reagenserna innehåller natriumazid som konserveringsämne. Se avsnitt 5 "Varningar och försiktighetsåtgärder".

Förberedelse av reagenser

Kontrollerna är lyofiliserade. Alla andra reagenser är bruksfärdiga.

Låt kontrollflaskorna anta rumstemperatur (18...25°C) innan de öppnas. Späd kontrollerna genom att tillsätta 1,0 mL destillerat eller dejoniserat vatten till varje flaska. Förslut och blanda ordentligt genom att försiktigt vagga eller vända flaskan, undvik skumbildning. Låt stå 30 min före användning.

Instabilt reagens

Förändringar av reagensets fysiska utseende eller kalibreringskurvans lutning, eller att kontrollerna inte ligger inom utsatt område kan vara en indikation på att reagentet är instabilt. Använd inte reagentet om du misstänker något av det ovan nämnda.

5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Hälsa- och säkerhetsinformation

- Endast för *in vitro*-användning.
- Pipettera inte med munnen.
- Alla patientprover och kontroller ska hanteras som potentiellt infektiöst material.

- Kontrollerna innehåller material av humant ursprung, som har testats och funnits vara negativt för antikroppar mot humant immunbristvirus (HIV 1 och 2), antikroppar mot hepatit C-virus (HCV) och hepatit B-ylantigen (HBsAg). Som en försiktighetsåtgärd ska produkten hanteras som om den vore ett smittförande material.
- Lyofiliserade reagenser innehåller < 1 % natriumazid (Aquatic Chronic 3). Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer (H412). Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra (EUH032). Undvik utsläpp till miljön (P273). Innehållet lämnas till kassering enligt nationell och lokal lagstiftning (P501). Azider kan reagera med metaller i avloppsrör och bilda explosiva ämnen. Var därför alltid noggrann med att spola rikligt med vatten efter det att reagens har hållits ut i avloppet.
- Rekonstituerade reagenser och vätskereagenser innehåller < 0,1 % natriumazid, vilket inte anses vara skadlig koncentration.
- Kitet innehåller ¹²⁵I (halveringstid $T_{1/2}$ på 60 dagar) som emitterar 35,5 keV gammastrålning och 27–32 keV röntgenstrålning. Radioaktivt material som ingår i detta kit får bara tas emot, införskaffas, innehas och användas av läkare, kliniska laboratorier, forskningsinstitut och sjukhus och bara användas för kliniska tester och laboratorietester in vitro utan intern eller extern administration av materialet eller strålning från det till människor eller djur. Allt radioaktivt material ska förvaras och hanteras enbart inom specifika därför avsedda områden. Inköp, förvaring, användning eller utbyte av radioaktiva produkter lyder under de lagar som gäller i användarens land.
- Undvik kontakt med hud och ögon. Tvätta omedelbart med rikligt med vatten om kontakt med hud uppstår och dekontaminera enligt lokala föreskrifter för spill.
- Spill från radioaktiva material ska omedelbart torkas upp med ett rengöringsmedel och det kontaminerade rengöringsmaterialet ska överföras till en behållare för radioaktivt avfall eller hanteras enligt strålsäkerhetsmyndighetens rekommendationer.
- Radioaktivt avfall måste bortskaffas enligt tillämpliga lagar. Följ de regler och procedurer som gäller på din institution avseende hantering, förvaring och bortskaffande av radioaktiva material.

Analytiska försiktighetsåtgärder

- Använd inte produkten efter det utgångsdatum som anges på den yttre förpackningen.
- Överskrid inte hållbarhetstiden för öppnat reagens.
- Blanda inte komponenter från olika lotnummer och olika tester.

6. PROVTAGNING OCH FÖRBEREDELSE

Inga särskilda patientförberedelser är nödvändiga före provtagning. Serum tas som ett vanligt venprov, följer de normala rutinerna för venprovtagning. Testen kan inte utföras på plasmaprover.

Starkt lipemiska, hemolytiska eller mikrobiellt kontaminerade patientprover ska undvikas.

Förvaring och hantering av prover

Efter provtagning låt blodet koagulera och separera serum genom centrifugering. Proverna är hållbara 5 dagar vid 2...8°C, och under längre perioder vid –20°C. Upprepad frysning och tining av proverna bör undvikas.

Prover med hög PINP-halt kan spädas med 0.9 % saltlösning.

7. PROCEDUR

Se avsnitt 4 "Reagens" för en lista över reagens .

Material som behövs men inte finns i kitet

- Pipetter (för exakt pipettering av 50 µL, 200 µL, 500 µL och 1000 µL)
- Teströr (polystyren, t ex 12 x 75 mm)
- Absorberande papper
- Paraffinfil
- Vortexmixer
- Vattenbad (för att hålla temperatur $37 \pm 1^\circ\text{C}$)
- Dekanteringsrack
- Centrifug (kapacitet minst 2000 g
Kylcentrifug är att föredra)
- Gammräknare
- Destillerat eller dejoniserat vatten

Instrument

Använd en gammräknare avsedd för mätning av ¹²⁵I. Utför effektivitetsmätningar regelbundet liksom bakgrunds-mätningar. Regelbunden kalibrering av instrumentet rekommenderas. Se instrumenttillverkarens manual för detaljer rörande installation, användning, underhåll och kalibrering.

Bruksanvisning

1	Låt alla reagens, kontroller och prover anta rumstemperatur (18...25°C) minst 30 minuter före användning. Blanda före användning genom att försiktigt vända flaskorna.
2	Märk polystyren teströren som dubbelprov för NSB (non-specific binding), kalibratorer, kontroller, patientprover och Total Counts.
3	Pipettera 50 µL av kalibratorer, kontroller och patientprover i de uppmärkta rören. Ett av patientproven eller 0 µg/L kalibrator pipetteras i för NSB rören.
4	Pipettera 200 µL av Tracer (röd) till alla rör.
5	Pipettera 200 µL av Antiserum (blå) till alla rör utom NSB och Total Counts. Pipettera 200 µL av destillerat eller dejoniserat vatten till NSB rören.
6	Blanda alla rör på en vortexmixer, täck med paraffinfil och inkubera 2 timmar i $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
7	Blanda Prokollagen separationsreagenset ordentligt genom varsam skakning och tillsätt 500 µL till alla rören utom Total Counts.
8	Blanda rören på en vortexmixer och inkubera 30 minuter i rumstemperatur.
9	Centrifugera alla rören utom Total Counts i 15 minuter vid 2000 x g (minimum) 4...20°C (4°C rekommenderas).
10	Häll av supernatanten från alla rör utom Total Counts och låt stå upp och ner och rinna av i några sekunder mot absorberande papper. Kontrollera att inte precipitatet dekanteras. Vänd inte rören ännu en gång efter det att de vänts upp. Felaktigheter i dekanteringen kan leda till dåliga dubbelvärden och felaktiga resultat.
11	Mät varje rör i en gammräknare minst 1 minut.
12	Beräkna resultatet beskrivet i avsnittet "Beräkning av resultat".

Analysprocedur – Kortfattad

(alla volymer i µL)

	Total	NSB	Kalibrator	Kontroll och okänd
Pipettera prov		50	50	50
Pipettera tracer (röd)	200	200	200	200
Pipettera antiserum (blå)			200	200
Pipettera destillerat/dejoniserat vatten		200		
Blanda		x	x	x
Inkubera 2 tim i 37°C		x	x	x
Pipettera separationsreagens		500	500	500
Blanda		x	x	x
Inkubera 30 min vid rumstemp.		x	x	x
Centrifugera 15 min / 2000 g		x	x	x
Dekantera		x	x	x
Mät 1 min	x	x	x	x

8. KVALITETSKONTROLL

Ett internt kvalitetssäkringsprogram rekommenderas för alla kliniska laboratorier liksom analys av kontroll i både höga och låga kalibreringsområdet för att kontrollera metodens kvalitet. Med UniQ PINP RIA följer två kontroller: PINP RIA Control 1 & 2. Förväntade värden ses på de separata blad som medföljer testen. Varje laboratorium bör ha egna godkända gränsområden för de kontroller som används. Medelvärdet på kontrollerna bör ligga inom det område som Aidian angivit. Det rekommenderas att använda minst två kit med olika tillverkningsnummer (batchnummer) för att bestämma kontrollernas gränsområden. När kontrollområdet bestämts ska kontroller analyseras som dubbelprov vid varje körning.

9. BERÄKNING AV RESULTAT

Vid automatisk resultatberäkning rekommenderas spline-funktions kurvanpassning. Resultat kan också tas fram manuellt på semi-log grafpapper.

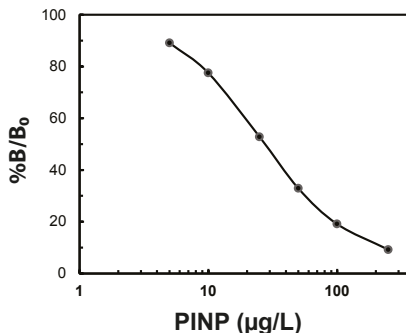
- **Beräkna** medelvärdet av Counts för alla rör (kalibratorer, prov, kontroller och NSB).
- **Beräkna** %B/B₀ från:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{kalibrator eller prov counts-NSB}}{\text{nollkalibrator counts - NSB}} \times 100$$

där B är den bundna radioaktiviteten för ett prov eller kalibrator, B₀ är den bundna aktiviteten för kalibrator 0 och NSB för radioaktiviteten för icke-specifik bindning.

- **Rita** en kalibreringskurva på semi-log grafpapperet med %B/B₀ värdena på Y-axeln och kalibratorernas PINP koncentration (µg/L) för kalibratorerna på X-axeln.
- **Bestäm** PINP-koncentrationerna på de okända proverna utifrån kalibreringskurva.
- **Prov** som ger resultat under lägsta kalibratorn ska så rapporteras
- **Prov som ger resultat över den högsta kalibratorn ska spädes och oanalyseras.** Efter spädning måste värdet korrigeras med spädningsfaktorn.

Fig. 1 Typisk kalibreringskurva.
Exempel.



Tabell 1 Beräkning av typiska resultat.
Exempel.

Rör	Medel cpm	Cpm- NSB	%B/B ₀	PINP (µg/l)
Total	50970			
NSB	845			
Kal. 0	28330	27485		
Kal. 5	25343	24498	89.1	
Kal. 10	22143	21289	77.5	
Kal. 25	15344	14499	52.8	
Kal. 50	9897	9052	32.9	
Kal. 100	6095	5250	19.1	
Kal. 250	3379	2534	9.2	
Okänd 1	10725	9880	35.9	44.6
Okänd 2	4572	3727	13.6	157

10. BEGRÄNSNINGAR I PROCEDUREN

Resultat från den här analysen ska användas tillsammans med övrig relevant kliniska information för diagnostiska och terapeutiska beslut. Därför rekommenderas inte UniQ PINP till screening för att bestämma osteoporesförekomst i en population.

Vid utvärdering av upprepade prover ska provet tas vid samma tidpunkt på dagen på grund av PINPs dygnsvariation med högre värden under natten.

Typ 1 kollagen produceras också av fibroblaster och kan därför påvisas i bindväv tillsammans med andra kollagentyper. Emellertid, då benvävnad är det mest kollagenrika organet är majoriteten av det cirkulerande PINP av osteoblastursprung.²⁵

PINP metaboliseras i levern.²⁶ Allvarliga leversjukdomar kan påverka clearance från cirkulationen och ge upphov till förhöjda PINP-nivåer.²⁷

Som vid all användning av tester med sekundär antikropp, kan prover som innehåller antikroppar (t ex heterofila antikroppar) reagera med kanin/get IgG och orsaka felaktiga resultat.

11. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Etniska skillnader, kost- och åldersvariationer kan medföra att angivna referensområden inte kan tillämpas på alla populationer. Nedan angivna observationer är enbart typiska exempel och speglar inte nödvändigtvis de referensområdet som kan hittas i en utvald klinisk population.

PINP värdet för till synes friska, vita finska vuxna har analyserats med UniQ™ PINP RIA kit. Den non-parametriska metod som rekommenderas av IFCC användes för att beräkna referensområden och konfidensområden för höga och låga värden.²⁸

Varje laboratorium bör därför ta fram sina egna representativa referensområden.

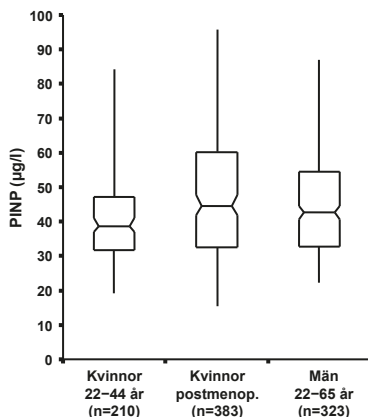
Tabell 2 Serum PINP förväntade värden

	Kvinnor	Kvinnor Postmenopausal*	Män
Ålder	25–44	52–62	22–65
Antal prover	210	383	323
Medelvärde	42 µg/L	48 µg/L	45 µg/L
Median	39 µg/L	45 µg/L	43 µg/L
Referens intervall**	19–83 µg/L	16–96 µg/L	22–87 µg/L
0.95- konfidensintervall för lågt referensområde	14–23 µg/L	15–19 µg/L	20–25 µg/L
för högt referensområde	71–96 µg/L	87–103 µg/L	77–94 µg/L

*Min. 3 års postmenopausal

**Referens intervall = 0.025 & 0.975 fraktiler

Fig. 2 Box-Whisker plot över fördelningen av PINP koncentrationer hos friska vuxna. Den horisontella linjen i varje box representerar median värdet medan den över och nedre påvisar det interkvartila området, värden 25 % över och under medelvärdet. Den vertikala linjen visar referensområdet (0.025 & 0.975 fraktiler).



De ovan presenterade resultaten visar att PINP-koncentrationerna i en population av menopausala kvinnor är förhöjd jämfört med koncentrationen hos kvinnor i åldersgruppen 25–44 ($p = 0.0005$, Mann-Whitney). Ökningen av PINP speglar den ökade benomförmringen som associeras med östrogenbrist hos en postmenopausal population jämfört med en yngre population. Emellertid, det finns en överlappning i PINP mellan de två populationerna.

KLINISKA STUDIER

Bisfosfonat behandling

Användbarheten av UniQ PINP RIA för att mäta förändringar i benomformering under behandling med bisfosfonat (10 mg dagligen alendronate) studerades i en multicenter studie, dubbelblind placebo kontrollerad studie med amerikanska, postmenopausala kvinnor (minst 5 år sedan menopause²⁹) med definierad osteopores. Data från 124 patienterna fanns tillgängligt och som slumpvis lades till två olika grupper: 62 st fick behandling (TRM) och 62 stycken fick placebo (CTR). Samtliga deltagare i studien fick 500 mg/d kalcium supplement. Patienterna analyserades vid starttillfället och efter 3, 6 och 12 månader av behandling. Benmineraldensitet (BMD) mättes med dual-energy röntgen absorptiometri (DXA) och intakt PINP mättes med UniQ PINP RIA.

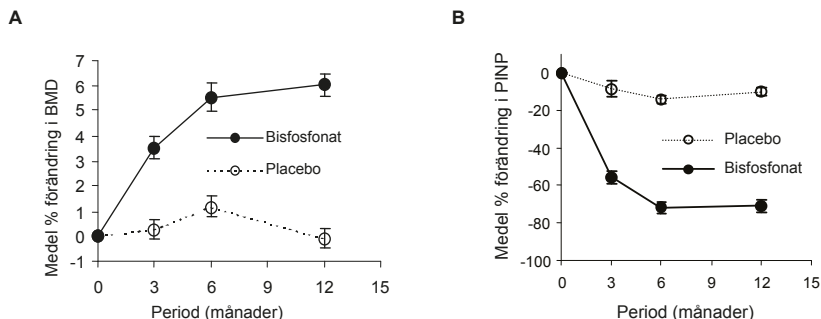
Data från studien presenteras i tabell 3 och Figur 3. Vid starttillfället var BMD $0.740 \pm 0.083 \text{ g/cm}^2$ (medelvärde $\pm$ SD) i CTR-gruppen och $0.727 \pm 0.104 \text{ g/cm}^2$ i TRM-gruppen. Efter 12 månader hade TRM-gruppens medel-BMD ökat med 6.0% jämfört med starttillfället. Skillnaden var signifikant vid samtliga måttillfällen jämfört med starttillfället ($p < 0.0001$). Ökningen i CTR-gruppen var mindre och tillfällig då den efter 12 månader gick tillbaka till starttillfallets nivå. Vid starttillfället var koncentrationen av PINP $62.5 \pm 18.5 \text{ }\mu\text{g/L}$ i CTR gruppen och $61.1 \pm 30.1 \text{ }\mu\text{g/L}$ i TRM gruppen. Medelkoncentrationen av PINP i TRM-gruppen sjönk med 70,8 % under 12-månadersbehandlingen. Vid alla tre måttillfällen var sänkningen signifikant ($p < 0.0001$) jämfört med starttillfället. Sänkningen i CTR-gruppen, som också fick kalcium supplement, var lägre: 9,8% under de 12 månaderna.

Förändringarna i BMD och PINP under bisfosfonatbehandlingen speglar behandlingens effekt på benomformering. Resultaten var förväntade och liknade de från andra studier som har visat en påtaglig sänkning av PINP-värden vid bisfosfonatbehandling.^{11, 30–31}

Tabell 3 Respons i % (medel) i BMD och PINP hos patienter med bisfosfonatbehandling eller placebo.

Test	Grupp	Medelprocent respons (SD) från starttillfallets värden		
		3 månader	6 månader	12 månader
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	-0.1 (3.2)
	Bisfosfonat	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	-8.6 (25.9)	-14.0 (25.5)	-9.8 (27.4)
	Bisfosfonat	-55.4 (34.0)	-71.6 (15.6)	-70.8 (15.5)

Fig. 3 Respons i % (medel) ($\pm$ SE) i (A) BMD och (B) PINP koncentration hos patienter med bisfosfonat (●) eller placebo (○).



För att uppnå klinisk signifikans, måste den procentuella förändringen mellan två mätningar överstiga både den analytiska (CV_a) och mellan individ (CV_i) variationen. Tröskelvärdet är den minsta procentuella förändringen och kan beräknas enligt följande

$$\text{Minimum Percent Change} = \sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV_i^2 + CV_a^2)}$$

Flera värden för PINP har publicerats t ex, Hannon och medarbetare¹² har rapporterat minsta procentuella förändring till 21 % för PINP

Hormonersättnings-terapi

Möjligheten att med UniQ PINP RIA speglar förändringar i benomformering under Hormon ersättningsterapi (HPT) hos postmenopausala kvinnor studerades i en randomiserad, dubbelblind studie.³²⁻³³ Studiens deltagare var till synes friska, finska kvinnor med minst tre år sedan menopaus. Data fanns tillgängliga från 44 individer som fick den lägsta behandlingsdosen: 1 mg oralt estradiol verate och 2.5 mg oralt medroxyprogesteron acetat dagligen. Patienterna analyserades vid starttillfället och efter 6 och 12 månaders behandling. BMD mättes med dual-energy röntgen absorptiometri och intakt PINP mättes med UniQ PINP RIA.

Data presenteras i Tabell 4 och Figur 4. Vid starttillfället var BMD 1.083 ± 0.182 g/cm² (medelvärde $\pm$ SD) och koncentrationen av PINP var 42.2 ± 15.3 µg/l.

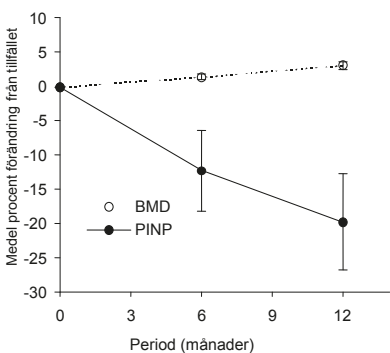
Vid 6 månader var BMDs medelökningen 1.4 % och efter 12 månader var ökningen 3.1 % jämfört med starttillfallets värde. PINP sjönk från starttillfallets värde med 12.3 % efter 6 månader och med 19.8 % efter 12 månader. Förändring i BMD och PINP var signifikant ($p < 0.0002$) vid båda mättillfällena jämfört med starttillfället.

Förändringar som observerades i BMD och intakt PINP under HRT speglar effekten som behandlingen har på benomformeringen även vid lågdosbehandling som användes i studien. Resultaten var förväntade och liknande tidigare rapporter som alla visade signifikant sänkning i PINP-nivåer under olika typer av hormon ersättningsterapier.^{12-13, 15}

Tabell 4 Respons som procentuell förändring (medel) i BMD och PINP koncentrationen hos postmenopausala patienter med kombinerad lågdos hormonersättnings-terapi.

Test	Medel procent förändring (SD) från värdet vid starttillfället	
	6 månader	12 månader
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Fig. 4 Respons som procentuell förändring (± SE bars) i BMD (○) och PINP koncentration hos postmenopausala patienter med kombinerad lågdos hormonersättnings-terapi.



Teriparatidbehandling

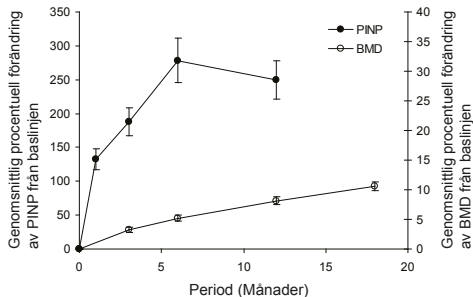
Teriparatid, humant paratyroidhormon [PTH] 1–34, av rekombinant DNA-ursprung, stimulerar benbildningen. I en randomiserad dubbelblind studie på 19 kliniker undersöktes hur väl UniQTM PINP RIA speglar förändringar i benombildningen efter teriparatidbehandling för behandling av osteoporos.³³ Studiedeltagarna var postmenopausala kvinnor i öppensjukvården med konstaterad osteoporos, minst 5 år efter menopausen. En undergrupp av deltagarna fick en dos på 20 µg teriparatid en gång per dag med dagligt tillägg av kalcium (1000 mg) och D-vitamin (400–800 IU) under hela studien. Data samlades in retrospektivt från 62 patienter i åldern 64,9 ± 7,8 år (genomsnittlig ± SD) som fick teriparatid och som hade fullständiga resultat för BMD och PINP tillgängliga vid de schemalagda provtagningspunkterna. BMD i ländryggen (L1–L4) mättes hos alla patienter genom DXA-skanning med användning av Lunar- eller Hologic-densitometrar vid baslinjen och vid 3, 6, 12 och 18 månaders teriparatidbehandling. Intakt PINP mättes vid baslinjen och vid 1, 3, 6 och 12 månaders behandling med användning av UniQTM PINP RIA-analysen. Teriparatidbehandlingen resulterade i en genomsnittlig ökning av BMD genom hela studieperioden där ökningarna var statistiskt signifikanta vid alla tidpunkter (p<0,0001) jämfört med baslinjen. Genomsnittlig BMD ökade med 0,025 g/cm² vid 3 månader, 0,039 g/cm² vid 6 månader, 0,061 g/cm² vid 12 månader och 0,079 g/cm² vid 18 månader. Den genomsnittliga PINP-koncentrationen ökade med 59 µg/L från baslinjen vid 1 månad, 82 µg/L vid 3 månader, 117 µg/L vid 6 månader och 103 µg/L vid 12 månader. Ökningen av PINP-koncentrationen jämfört med baslinjen var statistiskt signifikant vid alla tidpunkter (p <0,0001).

Den procentuella förändringen från baslinjen för BMD och PINP beräknades vid varje tidpunkt. De genomsnittliga procentuella förändringarna visas i tabell 5 och grafiskt i figur 5. Medelvärdena för PINP och BMD ökade som svar på teriparatidbehandlingen. PINP nådde sitt toppvärde vid 6 månader följt av en ringa sänkning vid 12 månader jämfört med tidpunkten vid 6 månader. Genomsnittlig BMD ökade som svar på behandling, och det högsta värdet observerades i slutet av studieperioden.

Tabell 5 Svar som genomsnittlig procentuell förändring ($\pm$ SD) av BMD och PINP-koncentrationen hos 62 postmenopausala kvinnor med osteoporos som fick en dos på 20 μ g teriparatid en gång per dag.

Test	Förändring (genomsnittlig $\pm$ SD)	Förändring (genomsnittlig $\pm$ SD)	Förändring (genomsnittlig $\pm$ SD)	Förändring (genomsnittlig $\pm$ SD)	Förändring (genomsnittlig $\pm$ SD)
	1 månad	3 månader	6 månader	12 månader	18 månader
BMD	NA	3.3 $\pm$ 3.4 %	5.2 $\pm$ 3.8 %	8.1 $\pm$ 5.1 %	10.6 $\pm$ 5.6 %
PINP	132.6 $\pm$ 118.2 %	187.8 $\pm$ 164.2 %	278.5 $\pm$ 257.1 %	249.5 $\pm$ 221.7 %	NA

Fig. 5 Svar som genomsnittlig procentuell förändring ($\pm$ SE bars) av BMD och PINP-koncentrationen hos 62 postmenopausala kvinnor med osteoporos som fick en dos på 20 μ g teriparatid en gång per dag.



Observerade förändringar av BMD och intakta PINP-nivåer speglar den anabola effekten av teriparatidbehandling på benombildning. Resultaten var väntade och jämförbara med andra rapporter, som har visat signifikanta öknings av PINP-nivåer under teriparatid-behandling.^{17–20} En algoritm för användning av PINP för att övervaka patienter som behandlas med teriparatid har utvecklats delvis baserat på samma kliniska material som i studien ovan³⁴, vilket understryker den kliniska nyttan med PINP-mätningar vid behandling av postmenopausala kvinnor.²¹

12. SPECIFIKA DATA FÖR ANALYSEN

Resultaten som presenteras nedan härstammar från test utförda hos Aidian och de representerar typiska data.

Linjaritet

Linjariteten för UniQ PINP RIA testen analyserades genom att späda prover med 0 µg/l kalibratorn som medföljer kitet. Utbyte % beräknades genom att dividera uppmätt koncentration med förväntad koncentration och multiplicera med 100.

Tabell 6 PINP-analysens linjaritet

Prov	Spädning	Förväntat (µg/L)	Uppmätt medelvärde (µg/L, n = 4)	Beräknat för ospädd (µg/L)	Utbyte (%)
1	Outspädd	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			MV	189.3	
			SD	12	
			CV %	6.3	
2	Outspädd	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			MV	79.9	
			SD	2.4	
			CV %	3	

Precision

Testens inomserie- och mellanserieprecision bestämdes på poolade serumprover och kontrollprover med olika koncentrationer av PINP.

Tabell 7 Intra-assay / Inter-assay precision

Inom serie precision av 18 eller 20 dubbelprover			Mellan-serie precision av 10 dubbelprover		
Prov	Medelvärde (µg/L)	CV (%)	Prov	Medelvärde (µg/L)	CV (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Utbyte

Utbyte studerades genom att tillsätta känd mängd renat PINP antigen till ett prov innehållande 19,1 µg/l of endogent PINP. Provet mättes i duplikat med UniQ PINP RIA och utbyte % beräknades. Utbyte % är ökningen i koncentration dividerat med det "spikade" provets koncentration multiplicerat med 100.

Tabell 8 PINP-analysens utbyte

Spike (µg/L)	Mätresultat (µg/L)	Ökning (µg/L)	Utbyte (%)
—	19.1	—	—
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Specificitet

Intakt UniQ PINP RIA kit är mycket specifikt för den intakta formen av N-terminala propeptiden av typ 1 kollagen. Den lågmolekylära monomeriska nedbrytningsprodukten av PINP peptiden (Col1) detekteras inte i små mängder (korsreaktion på 2,7 %). UniQ PINP RIA korsreagerar inte med N-terminala propeptiden av typ III prokollagen (PIIINP).

Interferenser

Serumbilirubin i koncentration < 400 µmol/L (<23 mg/dL) påverkar inte analysen. Serumhemoglobin i koncentration upp till 5 g/L (500 mg/dL) eller triglycerider upp till 30 g/L (3000 mg/dL) interfererar inte heller med analysen.

Detektionsgräns

Detektionsgränsen för UniQ PINP RIA fastställdes genom att mäta 20 dubbelprover med 0 µg/L kalibrator och kalibreringskurvan (4 replikat) tre gånger. Den minsta mätbara mängd PINP i analysen var < 2 µg/L, definierad som två gånger standarddeviationen av noll-bindningsvärdet.

Mätområde

Mätområde för UniQ PINP RIA är 5–250 µg/L.

13. SPÅRBARHET

Analyten i UniQ PINP RIA kalibratorerna är spårbar till tillverkarens "master standard" vars värde bestäms med hjälp av analys av aminosyroras sammansättning.

14. AVFALLSHANTERING

- Innehållet lämnas till kassering enligt nationell och lokal lagstiftning.
- Alla patientprover, använda kyvetter och provtagningsrör ska hanteras och kasseras som biologiskt och potentiellt infektiöst material.
- Radioaktivt avfall måste bortskaffas enligt tillämpade lagar.
- Material i komponenterna:
 - Papper: Bruksanvisning
 - Kartong: Kitets förpackning
 - Plast: Flaskor för serarationsreagenset, flasklock
 - Gummi: Proppar
 - Glas: Tracer, antiserum, kalibrator och kontrollflaska
 - Skumgummi
- Vid användning enligt god laboratoriepraxis, god arbetshygien samt instruktionerna i denna bruksanvisning bör reagensen inte utgöra någon hälsofara.

UniQ® PINP RIA

Intakt N-terminal propeptid type I prokollagen, radioimmunoassay

1. ANVENDELSE

UniQ PINP RIA er et kvantitativt radioimmunoassay designet for bestemmelse av intakt aminoterminalt propeptid av type I prokollagen, en indikator for osteoblastaktivitet i humant serum. Testen er utviklet som et hjelpemiddel i overvåking av postmenopausal osteoporose.

Kun for *in vitro* diagnostikk.

2. OPPSUMMERING OG FORKLARING

Type I kollagen, som syntetiseres av fibroblaster og osteoblaster, er det kollagenet som det er mest av i kroppen, og det eneste kollagenet som fins i mineralisert bein, hvor det utgjør mer enn 90 % av den organiske matriks. Da bein er det organet som inneholder mest kollagen og metabolsk høyaktivt gjennom hele livet, stammer det meste av syntetisert type I kollagenet fra bein osteoblaster.

Kollagen i bein er dannet fra et større protein, type I prokollagen, som består av tre aminosyrekjeder som er sammenvevd for å danne en stavliggende trippelheliks. Type I prokollagen har ekstensjoner av propeptid i begge ender av molekylet, som fjernes av spesifikke proteinaser før kollagenmolekylene som dannes samles i kollagene fibre. Begge propeptidene kan være tilstede i sirkulasjonen, hvor konsentrasjonen gjenspeiler produksjonen av type I-kollagen. UniQ PINP RIA assay måler serumkonsentrasjonen av det aminoterminalt propeptidet av type I prokollagen (PINP)¹. Ettersom konsentrasjonen av dette propeptidet er direkte proporsjonalt med mengden nytt kollagen inkorporert i bein, kan den brukes til å vurdere beindannelse.

I løpet av beindannelse produseres beinmatriks før mineralisering inntreffer, derfor er PINP en tidlig markør av beindannelse. Bein alkalisk fosfatase, et cellemembranenzym tilstede i preosteoblaster og osteoblaster, er en annen tidlig markør for osteoblastaktivitet.² Osteocalcin er en senere markør for osteoblastdifferensiering som vises i beinmineraliseringsens fase.³

Beinvev er bemerkelsesverdig metabolsk aktivt og bygges om gjennom hele livet. Ombygging av beinvev oppnås ved to motvirkende prosesser: beindannelse og beinresorpsjon, som under normale forhold er tett koblet til hverandre. Metabolske beinsykdommer er preget av ubalanse i beinomsetningen og fører ofte til en frakopling mellom beindannelse og resorpsjon.⁴ En indikator på omsetning av type I kollagen, for eksempel PINP, er svært nyttig for å undersøke omdannelse av skjelettet under normale og unormale forhold.

UniQ PINP analysen er et sensitivt verktøy for å vurdere økt beinomsetning hos postmenopausale kvinner⁵⁻⁹ og kan være spesielt nyttig for å overvåke effekten av anti-resorptiv og anabol terapi av beinmetabolismen.¹⁰⁻²¹ Fastsettelsen av PINP har også blitt brukt til å påvise økning i omsetning av type I kollagen ved sykdomstilstander som f.eks. Pagets beinsykdom.²²⁻²⁴

3. TESTPRINSIPP

UniQ PINP RIA kit er basert på kompetitiv radioimmunoassay teknikk. En kjent mengde merket PINP og en ukjent mengde av umerket PINP i prøven konkurrerer om et begrenset antall av høyaffinitets bindingssteder av polyklonalt kanin anti-PINP antistoff. Et sekundært antistoff, rettet mot kanin IgG og coatet med kaolinpartikler, benyttes for å skille antistoff-bundet PINP fra fritt PINP. Radioaktivitet fra bundet tracer-antigen måles i en gammateller. Mengden av merket PINP i prøverøret er omvendt proporsjonal med mengden av PINP i prøven. Konsentrasjonene i ukjente

prøver kalkuleres ved hjelp av en kalibreringskurve som er basert på den samtidige testingen av UniQ PINP RIA kalibratorer som inneholder 0–250 µg/l PINP.

4. REAGENS

UniQ® PINP RIA, Cat. No. 67034

Komponent navn og opprinnelse	Symbol	 100	Stabilitet ved 2...8°C	
			Uåpnet	Opnet
Tracer	Ag ¹²⁵ I	22 ml Radioaktivt < 200 kBq	Inntil utløpsdato angitt på etiketten	6 uker
Antiserum ORIG RAB	Ab	22 ml	Inntil utløpsdato angitt på etiketten	6 uker
Kalibrator	CAL xxµg/l	7 x 0.5 ml	Inntil utløpsdato angitt på etiketten	6 uker
Kontroll ORIG HUM	CONTROL #	2 x 1.0 ml	Inntil utløpsdato angitt på etiketten	6 uker etter rekonstituering.
Procollagen Separasjonsreagens	REAG SEPAR	60 ml	Inntil utløpsdato angitt på etiketten	6 uker
Bruksanvisning				

Reagenser inneholder natriumazid som konserveringsmiddel, se kapittel 5 “Advarsler og forholdsregler”.

Klargjøring av reagenser

Kontrollene er frysetørket. Alle andre reagenser er klar-til-bruk.

La kontrollflaskene få romtemperatur (18...25°C) før de åpnes. Rekonstituer kontrollene ved å tilsette 1,0 ml destillert eller deionisert vann til hver flaske. Kork flaskene og vend forsiktig for å unngå skumdannelse. La stå i 30 minutter før bruk.

Forringelse av reagenser

Endringer i utseendet av reagensenes, kalibreringskurvens stigning eller kontrollverdier utenfor produsentens godkjente range kan være en indikasjon på ustabile reagenser. Reagenser som mistenkes å være ødelagte skal ikke brukes.

5. ADVARSLER OG FORSIKTIGHETSREGLER

Helse- og sikkerhetsinformasjon

- Bare for in vitro-diagnose.
- Ikke bruk munnen ved bruk av pipetten.
- All pasientprøver og kontroller skal behandles som potensielt smittefarlig materiale.
- Kontrollene inneholder humant materiale som er testet og påvist fritt for antistoffer mot humant immunsviktivirus

(HIV 1 og 2), hepatitt C-virus (HCV) og hepatitt B-overflateantigen (HBsAg). For sikkerhets skyld skal kontrollene håndteres som om det inneholder smittestoffer.

- Lyofiliserede reagenser inneholder < 1 % natriumazid (Aquatic Chronic 3). Skadelig, med langtidsvirkning, for liv i vann (H412). Ved kontakt med syrer utvikles meget giftig gass (EUH032). Unngå utslipp til miljøet (P273). Indhold leveres til avhending i samsvar med nasjonal og lokal lovgivning (P501). Azider kan reagere med metall i avløpsrør og danne eksplosive forbindelser. Opphopning av azider kan unngås ved å bruke rikelig med vann når reagensene tømmes ut.
- Rehydrerte reagenser og reagenser i væskeform inneholder natriumazid < 0,1 %, en konsentrasjon som betraktes som ufarlig.
- Settet inneholder ¹²⁵I (halveringstid $T_{1/2}$ på 60 dager), som avgir gammastråler på 35,5 keV og røntgenstråler på 27 til 32 keV. Det radioaktive materialet i dette settet kan bare tas imot, anskaffes, oppbevares og brukes av leger, kliniske laboratorier, forskningsinstitusjoner og sykehus og kan bare brukes in vitro i kliniske tester og laboratorietester som ikke omfatter intern eller ekstern administrasjon av materialet eller resulterende stråleeksponering for mennesker eller dyr. Alt radioaktivt materiale skal lagres og håndteres på steder som spesifikt er satt av til dette formålet. Kjøp, lagring, bruk og utveksling av radioaktive produkter er underlagt lovgivningen i landet der produktet brukes.
- Unngå kontakt med huden og øynene. Vask øyeblikkelig med mye vann ved hudkontakt og dekontaminer i henhold til lokale regler for utslislet søl.
- Søl som inneholder radioaktivt materiale, skal fjernes umiddelbart med rengjøringsmiddel, og det forurensede rengjøringsmaterialet skal legges i beholderen for radioaktivt avfall eller håndteres i samsvar med anbefalingene fra myndighetene for stållever.
- Radioaktivt avfall må avhendes i samsvar med gjeldende lovgivning. Konsulter reglene og prosedyrene som gjelder for institusjonen, for håndtering, lagring og avhending av radioaktivt materiale.

Analytiske forholdsregler

- Produktet skal ikke brukes etter utløpsdatoen som er oppført på emballasjen.
- Ikke overskrid stabilitetstiden for åpne reagenser.
- Ikke bland komponenter med forskjellig produksjonsnummer eller fra forskjellige tester.

6. PRØVETAKING OR FORBEREDELSE

Det kreves ingen spesiell forberedelse av pasienten før prøvetaking.

En skal bruke serum og en normal veneprobe skal samles med vanlig brukt medisinsk etter normale forhåndsregler for venepunksjon. Testen skal ikke benyttes med plasmaprøver.

Stærkt lipæmiske, hæmolytiske eller mikrobielt kontaminerede patientprøver skal undgås.

Prøvehåndtering og lagring

Etter prøvetaking, la prøven koagulere og separer serum ved sentrifugering. Serumprøver kan lagres i inntil 5 dager ved 2...8°C og for lengre perioder ved -20°C eller lavere. Unngå repetert frysing og tining.

Prøver med høye PINP-konsentrasjoner kan fortynnes med 0,9 % saltløsning.

7. PROSEDYRE

Se kapittel 4, "Reagens", for liste av reagenser.

Utstyr som kreves, men som ikke er inkludert

- Pipetter (som kan pipettere nøyaktig 50 µl, 200 µl, 500 µl og 1000 µl)
- Testrør (polystyren, f.eks. 12 X 75 mm),
- Absorberende papir
- Parafilm
- Vortexer
- Vannbad (ved 37±1°C)
- Dekanteringsstativ
- Sentrifuge (som kan kjøres minst 2000 x g Helst med kjøling),
- Gammateller
- Destillert eller deionisert vann

Instrumenter

Enhver gammateller som er i stand til å måle ¹²⁵I kan brukes. Instrumentets telleeffektivitet og bakgrunnstall skal regelmessig kontrolleres. Det anbefales å kalibrere instrumentet systematisk. Se i produsentens brukermanual for instrumentet vedrørende detaljer ved installering, bruk, vedlikehold og kalibrering.

Prosedyre detaljer

1	Sørg for at alle reagenser, kontroller og prøver får romtemperatur (18...25°C) før bruk. Bland alle reagensene godt ved å vende forsiktig før bruk.
2	Merk testrørene i duplikat for NSB (non-spesifikk binding), kalibratorer, kontroller, pasientprøver og Total-Counts.
3	Pipetter 50 µl kalibrator, kontroller eller pasientprøver i egnede rør. Hvilken som helst av pasientprøvene eller 0 µg/l kalibrator kan pipetteres i NBS-røret.
4	Pipetter 200 µl av Tracer (rød) i alle rørene.
5	Pipetter 200 µl av Antiserum (blå) i alle rørene unntatt i NSB og Total-Counts. Pipetter 200 µl destillert eller deionisert vann i NSB-rørene.
6	Bland alle rørene på en vortexer, dekk med parafilm og innkuber i 2 timer ved 37±1°C.
7	Bland Procollagen separasjonsreagens godt ved å vende flasken. Tilsett 500 µl til alle rørene unntatt Total-Counts.
8	Bland rørene på en vortexer og inkuber i 30 minutter ved romtemperatur.
9	Sentrifuger alle rør unntatt Total-Counts i 15 minutter ved 2000 g ved 4...20°C (4°C anbefales).
10	Dekanter supernatanten fra alle rør unntatt Total-Counts ved å snu alle samtidig. Bank rørene forsiktig mot absorberende papir, la dryppe av i noen sekunder for å fjerne gjenværende væske. Pass på så ikke presipitatet dekanteres. Vend ikke rørene opp-ned igjen etter at de har vært vendt en gang. Feil i dekantering og blotting av rør kan resultere i dårlig e replika og fell verdier.
11	Mål hvert rør med en gammateller i 1 minutt.
12	Beregn resultatene som beskrevet i avsnittet "Beregning av resultater".

Testprosedyre – sammendrag

(alle volum er oppgitt i µl)

	Total	NSB	Kalibrator	Kontroll og ukjent
Pipetter prøve		50	50	50
Pipetter tracer (rød)	200	200	200	200
Pipetter antiserum (blå)			200	200
Pipetter dest./deion. vann		200		
Bland		x	x	x
Inkuber 2 timer ved 37°C		x	x	x
Pipetter separasjonsreagens		500	500	500
Bland		x	x	x
Inkuber 30 min ved RT*		x	x	x
Sentrifuger 15 min / 2000 g		x	x	x
Dekanter		x	x	x
Tell 1 min	x	x	x	x

8. KVALITETSSIKRING

Et internt kvalitetssikringsprogram anbefales for alle kliniske laboratorier, selv om analyse av kontrollsera både i det høye og det lave referanseområdet utføres for å kontrollere prosedyrens ytelse. UniQ PINP RIA assay har to kontrollmaterialer: PINP RIA Control 1 & 2. Forventede områdene til kontrollene er oppgitt på et separat ark som følger med kitet. Det anbefales at hvert laboratorium etablerer godkjente grenseområder for kontrollene som benyttes i laboratoriet. Middelverdien av kontrollene bør ligge innenfor det aksepterte området oppgitt av Aidian. Det anbefales å bruke minst to kit med ulike lotnummer for å bestemme kontrollenes grenseområde. Etter at kontrollenes grenseområde er bestemt skal kontroller kjøres i duplikat med hvert oppsett.

9. BEREGNING AV RESULTATER

Til automatisk beregning av resultater anbefales tilpasning med splinekurve. Resultatene kan også beregnes manuelt på semilogaritmisk papir.

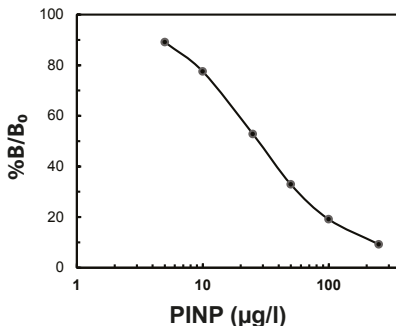
- **Beregn** middelverdien for alle kalibratorer, prøver kontroller og NSB.
- **Beregn** % B/B₀ fra:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{kalibrator- eller prøve-counts} - \text{NSB}}{\text{0-kalibrator counts} - \text{NSB}} \times 100$$

Der B er bundet radioaktivitet til en prøve eller kalibrator, B₀ er bundet radioaktivitet til kalibrator 0 og NSB er radioaktivitet til non-spesifikk binding.

- **Tegn** en kalibreringskurve på semi-logaritmisk papir med verdiene av %B/B₀ på y-aksen og PINP konsentrasjonen (µg/l) av kalibratorene på x-aksen.
- **Bestem** PINP-konsentrasjonene på de ukjente prøvene ved hjelp av kalibreringskurven.
- **Enhver prøve som leses lavere enn den laveste kalibratoren skal rapporteres som dette.**
- **Enhver prøve som leses høyere enn den høyeste kalibratoren skal fortynnes og rettestes.** Etter fortynning må verdiene korreleres for fortynningsfaktoren.

Fig. 1 Typisk kalibreringskurve.
Denne kalibreringskurven er bare et eksempel.



Tabell 1 Beregning av resultater ved bruk av typiske data. Dataene er bare et eksempel og må ikke brukes til å kalkulere prøvesvar.

Rør	MV cpm	cpm- NSB	%B/B ₀	PINP (µg/l)
Total	50970			
NSB	845			
Kal 0	28330	27485		
Kal 5.0	25343	24498	89.1	
Kal 10	22143	21289	77.5	
Kal 25	15344	14499	52.8	
Kal 50	9897	9052	32.9	
Kal 100	6095	5250	19.1	
Kal 250	3379	2534	9.2	
Ukjent 1	10725	9880	35.9	44.6
Ukjent 2	4572	3727	13.6	157

10. BEGRENŚINGER I PROSEDYREN

Resultater av denne testen skal brukes sammen med annen klinisk informasjon ved bestemmelse om diagnostikk og terapi. Derfor er ikke UniQ PINP assay anbefalt å benyttes til bruk som en screeningprosedyre for å påvise tilstedeværelse av osteoporose i den generelle befolkningen.

Ved evaluering av etterfølgende prøver, utfør prøvetaking på samme tidspunkt hver gang da det er døgnvariasjon av PINP med høyeste verdier på natten.

Type I kollagen syntetiseres også av fibroblaster og kan bli funnet i løst bindevev sammen med andre typer kollagen. Selv om bein er hovedorgan for kollagen og metabolsk aktivt gjennom livet er hoveddelen av sirkulerende PINP produsert i osteoblaster.²⁵

PINP metaboliseres i lever.²⁶ Alvorlig leversykdom kan påvirke utskillelse fra sirkulasjonen og forårsake forhøyede PINP-nivå i serum²⁷

Som med de fleste assays som benytter sekundære antistoff, kan prøver som inneholder antistoff (f.eks. heterofile antistoff) reagere med kanin/geit IgG og gi feil resultat.

11. FORVENTEDE VERDIER

På grunn av etnisk, kost og aldersvariasjoner vil ikke de angitte referansegrenser kunne anvendes på alle populasjoner. De referanseområder som er vist under er basert på et utvalg og vil ikke nødvendigvis reflektere de områder som vil observeres ved spesielle kliniske omstendigheter.

PINP-verdier hos sannsynlig friske, hvite, Finske voksne ble målt med UniQ PINP RIA kit. Non-parametrisk metode anbefalt fra IFCC ble benyttet til beregning av referanseintervall for øvre og nedre grense.²⁸

Hvert laboratorium bør etablere sine egne representative forventede verdier for den lokale populasjonen.

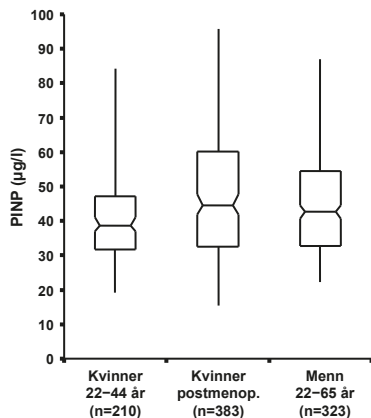
Table 2 Serum PINP forventede verdier

	Kvinner	Kvinner Postmenopausal *	Menn
Alder, år	25–44	52–62	22–65
Antall pasientprøver	210	383	323
Middelverdi	42 µg/l	48 µg/l	45 µg/l
Median	39 µg/l	45 µg/l	43 µg/l
Referanseintervall **	19–83 µg/l	16–96 µg/l	22–87 µg/l
0,95-confidensintervall			
for nedre referanseintervall	14–23 µg/l	15–19 µg/l	20–25 µg/l
for øvre referanseintervall	71–96 µg/l	87–103 µg/l	77–94 µg/l

*Minimum 3 år postmenopausal

**Referanseintervall = 0.025 & 0.975 fraktiler

Fig. 2 Box-Whisker plots av fordelingen av PINP-konsentrasjoner i sannsynlig friske voksne. Den horisontale linjen i hver boks representerer medianverdien, mens den øvre og nedre grensen for boksene indikerer interkvartile områder f.eks. 25 % over og under medianverdien. Enden på strekene viser grensen til referanseområdet (0.025 & 0.975 fraktiler).



Resultatene over viser at PINP-nivå i en populasjon av postmenopausale kvinner er forhøyet sammenlignet til konsentrasjonen hos kvinner i alderen 25-44 år ($p = 0.0005$, Mann Whitney). Denne økningen i PINP reflekterer økningen i omstruktureringen av bein assosiert med østrogenmangel i en postmenopausal populasjon sammenlignet med en yngre populasjon. Men det er et stort overlapp i PINP-nivå hos de to populasjonene.

KLINISKE STUDIER

Se engelsk bruksanvisning (s.13-16).

12. KARAKTERISKE EGENSKAPER

Resultatene vist nedenfor er oppnådd hos Aidian og representerer typiske ytelsesdata.

Linearitet

Linearitet for UniQ PINP RIA assay ble undersøkt ved å fortynne prøver med kalibrator med 0 µg/l. Recovery % ble beregnet ved å dele målt konsentrasjon med forventet konsentrasjon og å multiplisere med 100.

Tabell 6 Linearitet for PINP assay

Sample	Fortynning	Forventet (µg/l)	Målt middelverdi (µg/l, n = 4)	Beregnet for ufortynnet (µg/l)	Recovery (%)
1	Neat	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			Middelverdi SD CV %	189.3 12 6.3	
2	Neat	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			Middelverdi SD CV %	79.9 2.4 3	

Presisjon

Intra- og inter-assay presisjon ble bestemt ved bruk av poolet serum og kontrollprøver med ulike konsentrasjoner av PINP.

Tabell 7 Intra-assay / inter-assay presisjon

Intra-assay presisjon for 18 eller 20 replika			Inter-assay presisjon for 10 doble målinger		
Prøve	Middelverdi (µg/l)	CV (%)	Prøve	Middelverdi (µg/l)	CV (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Utbytte

Utbytte ble undersøkt ved å tilsette kjente mengder rensset PINP antigen til en prøve med 19.1 µg/l endogent PINP. Prøven ble målt i duplikat med UniQ PINP RIA assay og utbytte i % ble beregnet. Utbytte % er lik økning i konsentrasjon delt på konsentrasjonen spiket PINP multiplisert med 100.

Table 8 Utbytte / PINP

Spiket (µg/l)	Målt (µg/l)	Økning (µg/l)	Utbytte (%)
–	19.1	–	–
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Spesifisitet

UniQ PINP RIA assay er veldig spesifikt for intakte trimere former for N-terminal propeptid av type I prokollagen. Småmolekylære monomere degraderingsprodukt av PINP propeptid (Col1) påvises i lave nivå (kryssreaktivitet 2.7 %). UniQ PINP RIA kryssreagerer ikke med N-terminal propeptid fra type III prokollagen (PIIINP).

Interfererende substanser

Konsentrasjoner av serumbilirubin på <400 µmol/l (< 23 mg/dl) interferer ikke med testen. Serumhemoglobinkonsentrasjon opp til 5 g/l (500 mg/dl) eller triglyserider opp til 30 g/l (3000 mg/dl) interferer heller ikke.

Deteksjonsgrense

Deteksjonsgrense for UniQ PINP RIA assay ble bestemt ved måling av 20 replika av 0-kalibrator (0 µg/l) og kalibreringskurven (4 replika) tre ganger. Den minste målbare konsentrasjonen av PINP i testen var under 2 µg/l, definert som to ganger standardavviket til 0-bindingsverdi.

Måleområde

Måleområdet for UniQ PINP RIA er 5–250 µg/l.

13. SPORBARHET

Analytten i UniQ PINP RIA Calibrators er laget fra produsentens in-house kalibratorer som prepareres fra rensset PINP med verdi bestemt ved hjelp av aminosyre komposisjonsanalyse.

14. AVHENDING

- Innholdet skal avhendes i samsvar med nasjonal og lokal lovgivning.
- Alle pasientprøver, brukte kyvetter og prøveflasker skal håndteres og avhendes som potensielt smittefarlig materiale.
- Radioaktivt avfall må avhendes i samsvar med gjeldende lovgivning.
- Materialer i komponentene:
 - Papir: pakningsvedlegg
 - Papp: esken til testsettet
 - Plast: Flaske med separasjonsreagens, korker til flaskene
 - Gummi: Gummikorkene i kontrollglassene
 - Glass: tracer, antiserum, kalibrator, kontrollflasker
 - Skumgummi
- Når de brukes i samsvar med god laboratoriepraksis, god yrkeshygiene og instruksjonene i denne bruksanvisningen, utgjør de medfølgende reagensene ingen helsefare.

UniQ® PINP RIA

Intakt N-terminal propeptid af type I procollagen, Radioimmunoassay kit

1. ANVENDELSE

UniQ PINP RIA er en kvantitativ radioimmunanalyse til måling af intakt aminoterminal propeptid af type I procollagen, der er en indikator for osteoblastisk aktivitet, i humant serum. Testen er beregnet som hjælp til behandling af postmenopausal osteoporose.

Til *in vitro* diagnostisk brug.

2. BAGGRUND

Type I collagen, der er syntetiseret af fibroblaster og osteoblaster, er den mest almindelige collagentype i kroppen og den eneste, der findes i mineraliseret knoglevæv, hvor den udgør over 90 % af den organiske matrix. Da knoglerne udgør det største collagene organ og er metabolisk meget aktive livet igennem, stammer størstedelen af det syntetiserede type I collagen fra knogleosteoblaster.

Knoglecollagen er derivet af et større protein, type I procollagen, som består af tre aminosyrekæder, der er snoet sammen, så de udgør en stavtignende tredobbelt spiral. Type I procollagen har propeptidforlængelser i begge ender af molekylet, som fjernes af specifikke proteinaser, før de collagenmolekyler, der er formet på denne måde, samles til collagenfibre. Begge propeptider kan forekomme i blodkredsløbet, hvor koncentrationen af dem afspejler type I collagens synteseaktivitet. UniQ PINP RIA-analysen måler koncentrationen af aminoterminalt propeptid af type I procollagen (PINP) i serum.¹ Da koncentrationen af dette forlængelsespropeptid er direkte proportional med mængden af nyt collagen, der opbygges i knoglevævet, kan den også bruges til at vurdere knogledannelse.

Under knogledannelsen produceres knoglematrixen, inden der sker mineralisering, og PINP er således en tidlig markør for knogledannelse. Knoglespecifik alkalisk fosfatase, et cellemembranenzym i præosteoblaster og osteoblaster, er en anden tidlig markør for osteoblastaktivitet.² Osteocalcin er en senere markør for osteoblastdifferentiering i knoglemineraliseringsfasen.³

Knoglevæv er yderst metabolisk aktivt og remodelleres løbende gennem hele livet. Knogleremodellering sker ved to modsatvirkende processer, nemlig knogledannelse og knogleresorption, der under normale betingelser er tæt sammenkoblede. Metaboliske knoglesygdomme er kendetegnet ved ubalancer i knogleomsætningen og fører ofte til afkobling af knogledannelse og -resorption.⁴ En indikator for omsætning af type I collagen som f.eks. PINP er meget nyttig til undersøgelse af knogleremodellering under normale og unormale betingelser. UniQ PINP-analysen er et følsomt middel til at vurdere øget knogleomsætning hos postmenopausale kvinder,⁵⁻⁹ og det kan være særligt nyttigt til overvågning af effekten af antiresorptiv og anabolisk behandling på knoglemetabolisme.¹⁰⁻²¹ Bestemmelsen af PINP har også været anvendt til at påvise stigninger i omsætningen af type I collagen i sygdomstilstande som f.eks. Pagets knoglesygdom.²²⁻²⁴

3. TESTPRINCIP

UniQ PINP RIA-kittet bygger på kompetitiv radioimmunanalyseteknik. En kendt mængde mærket PINP og en ukendt mængde umærket PINP i prøven konkurrerer om et begrænset antal bindingssteder med høj affinitet for det polyklonale anti-PINP-kaninantistof. Et andet antistof, der er rettet mod kanin-IgG og coattet til kaolinpartikler, anvendes til udskillelse af det antistofbundne PINP og det frie PINP. Det bundne tracerantigens radioaktivitet måles med en

gammatæller. Mængden af mærket PINP i prøverøret er omvendt proportional med mængden af PINP i prøven. Koncentrationerne i ukendte prøver udledes af en kalibreringskurve baseret på den samtidige test af UniQ PINP RIA-kalibratorerne, der indeholder 0–250 µg/l PINP.

4. REAGENS

UniQ® PINP RIA, Cat. No. 67034

Komponent navn og oprindelse	Symbol	 100	Stabilitet ved 2...8°C	
			Uåbnet	Åbnet
Tracer	Ag ¹²⁵ I	22 ml Radioaktivt < 200 kBq	Indtil udløbsdato markeret på etiketten	6 uge
Antiserum ORIG RAB	Ab	22 ml	Indtil udløbsdato markeret på etiketten	6 uge
Kalibrator	CAL xxµg/l	7 x 0.5 ml	Indtil udløbsdato markeret på etiketten	6 uge
Kontrol ORIG HUM	CONTROL #	2 x 1.0 ml	Indtil udløbsdato markeret på etiketten	6 uger efter rekonstruering
Procollagen Separations-reagens	REAG SEPAR	60 ml	Indtil udløbsdato markeret på etiketten	6 uge
Brugsvejledning				

Reagenserne indeholder natriumazid som konserveringsmiddel. Se afsnit 5 "Advarsler og forholdsregler".

Forberedelse af reagens

Kontrollerne er lyophiliseret. Alle andre reagenser er klar til brug

Sørg for at kontrolflaskerne har stuetemperatur (18...25°C) før de åbnes. Tilsæt 1,0 ml destilleret vand til hver af flaskerne. Luk flaskerne og ryst forsigtigt og undgå at det skummer. Før brug, skal flaskerne henstå i 30 minutter.

Reagensforringelse

Ændringer i reagensernes fysiske udseende eller i kalibreringskurvens hældning eller kontrolserumværdier, der falder uden for det af producenten accepterede område, kan være tegn på reagensustabilitet. Brug ikke reagenser, hvis der er mistanke om forringet reagenskvalitet.

5. ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

Oplysninger om sundhed og sikkerhed

- Kun til diagnostisk brug in vitro.
- Undlad at mundpipettere.
- Alle patientprøver og -kontroller skal håndteres som potentielt smittefarligt materiale.

- Kontrollerne indeholder materiale af human oprindelse, der er testet negativt for antistoffer mod human immunodefektvirus (anti-HIV 1 og 2), hepatitis C-virus (HCV) og overfladeantigener til hepatitis B-virus (HBsAg). Kontrollerne skal som en sikkerhedsforanstaltning håndteres, som om det kan være smittebærende.
- Frysetørrede reagenser indeholder < 1 % natriumazid (Aquatic Chronic 3). Skadelig for vandlevende organismer med langvarige virkninger (H412). Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre (EUH032). Undgå udledning til miljøet (P273). Indholdet bortskaffes i overensstemmelse med nationale og lokale bestemmelser (P501). Azider kan reagere med metall iavløpsrør og danne eksplosive forbindelser. Opphopning av azider kan unngås ved å bruke rikelig med vann når reagensene tømmes ut.
- Rehydrerte reagenser og reagenser i væskeform inneholder natriumazid < 0,1 %, en konsentrasjon som betraktes som ufarlig.
- Kittet indeholder ¹²⁵I (halveringstid $T_{1/2}$ af 60 dage), som afgiver 35,5 keV gammastråler og 27–32 keV røntgenstråler. Radioaktivt materiale, der indgår i dette kit, må kun modtages, erhverves, ejes og anvendes af læger, kliniske laboratorier, forskningsinstitutioner eller hospitaler, og må kun bruges til kliniske test in vitro eller laboratoritest in vitro, som ikke omfatter indvortes indgift eller udvortes anvendelse af materialet eller stråling derfra til mennesker eller dyr. Alt radioaktivt materiale skal opbevares og håndteres i områder, der er specifikt beregnet til dette formål. Indkøb, opbevaring, anvendelse eller udveksling af radioaktive produkter skal foregå i henhold til den gældende lovgivning i brugerens land.
- Spild af radioaktivt materiale skal straks fjernes med et rengøringsmiddel, og de forurenede rengøringsmaterialer skal overføres til en beholder til radioaktivt affald eller håndteres i henhold til anbefalingerne fra de danske myndigheder.
- Radioaktivt affald skal kasseres i henhold til gældende lovgivning. Der henvises til de gældende regler og procedurer for virksomhedens håndtering, opbevaring og bortskaffelse af radioaktivt materiale i forhold til stråling.

Forholdsregler ved analyse

- Produktet må ikke anvendes efter den udløbsdato, der er trykt på den ydre emballage.
- Åbnede reagenser må ikke anvendes ud over stabilitetsperioden.
- Bland ikke komponenter fra forskellige lotnumre eller fra forskellige test.

6. PRØVETAGNING OG FORBEREDELSE

Der er ikke behov for særlig forberedelse af patienten inden prøvetagning.

Der skal bruges serum, og en normal venøs blodprøve skal udtages ved hjælp af en accepteret medicinsk teknik i overensstemmelse med de normale forsigtighedsregler for venepunktur. Analysen må ikke udføres med plasmaprøver. Stærkt lipæmiske, hæmolytiske eller mikrobielt kontaminerede patientprøver skal undgås.

Prøvehåndtering og -opbevaring

Når prøven er udtaget, skal blodet størkne, og serumet udskilles ved centrifugering. Serumprøver kan opbevares i op til 5 dage ved 2...8°C. Ved længere perioder skal det opbevares ved -20°C eller derunder. Gentagen nedfrysning og optøning skal undgås.

Prøver med høje PINP-koncentrationer kan fortyndes med 0,9 % saltvand.

7. PROCEDURE

Se kapittel 4 "Reagenser", for en liste af reagenser.

Nødvendige materialer, som ikke indgår i kittet

- Pipetter (50 µl, 200 µl, 500 µl og 1000 µl)
- Reagensrør
- Absorberende underlag
- Paraffin film
- Vortex mixer
- Vandbad (til 37±1°C)
- Dekanteringsstativ
- Centrifuge (mindst 2000 g)
- Gammataæller
- Destilleret vand

Instrumenter

Enhver gammataæller som måler ¹²⁵I kan bruges. Instrumentets måleegenskaber og baggrundsstrålingen bør regelmæssigt checkes. Det anbefales at kalibrere instrumentet systematisk. Læs instrumentets manual for detaljer vedrørende installering, anvendelse, vedligeholdelse og kalibrering.

Procedure detaljer

1	Sørg for at reagenser og prøvemateriale har nået stuetemperatur (18...25°C) før brug. Bland alle reagenser godt ved forsigtigt at vende dem før brug.
2	Marker reagensrørene dobbelt for NSB (ikke-specifik binding), kalibratorer, kontroller, patientprøver og total.
3	Pipetter 50 µl kalibrator, kontrol eller patientprøve i de beregnede reagensrør. Ligegyldigt hvilken af patientprøverne eller 0 µg/l kalibratoren kan pipetteres i NSB rørene.
4	Pipetter 200 µl tracer (rød) i alle rørene.
5	Pipetter 200 µl antiserum (blå) i alle rørene, men ikke NSB og total. Pipetter 200 µl destilleret vand i NSB rørene.
6	Miks alle rørene med en Vortex mixer, dæk med paraffin film og inkuber ved 37±1°C i 2 timer.
7	Miks separationsreagenset grundigt ved at vende glasset, og tilsæt 500 µl til alle rørene undtagen totalen.
8	Miks rørene med en Vortex mixer og inkuber i 30 minutter ved stuetemperatur.
9	Centrifuger alle rørene undtagen totalen i 15 minutter ved 2000 g (minimum) ved 4...20°C (4°C anbefales).
10	Dekanter supernatanten og bank forsigtigt munden af røret mod det absorberende underlag, undtagen totalen. Sørg for ikke at dekantere precipitatet. Vend ikke rørene når de har været vendt.
11	Mål hvert rør med en gammataæller i mindst 1 minut.
12	Beregn resultaterne som beskrevet i afsnittet 'Beregning af resultater'.

Testprocedure-kortfattet

(alle volumener angivet i µl)

	Total	NSB	Kalibrator	Kontrol og ukendt
Pipetter prøve		50	50	50
Pipetter tracer (rød)	200	200	200	200
Pipetter antiserum (blå)			200	200
Pipetter destilleret vand		200		
Miks		x	x	x
Inkuber 2 timer / 37°C		x	x	x
Pipetter separationsreagens		500	500	500
Miks		x	x	x
Inkuber 30 min./RT		x	x	x
Centrifuger 15 min./2000 g		x	x	x
Dekanter		x	x	x
Tæl i 1 min. eller 10.000 counts	x	x	x	x

8. KVALITETSKONTROL

Det anbefales, at alle kliniske laboratorier har et internt kvalitetssikringsprogram. Det foreslås således, at analysen af kontrolsera i både den øverste og nederste del af kalibreringskurven anvendes til overvågning af procedures udførelse. UniQ PINP RIA-analysen giver to kontrolmaterialer: PINP RIA Control 1 og 2. De forventede kontrolområder er anført på et separat ark, der følger med analysen. Det anbefales, at de enkelte laboratorier fastsætter acceptable områder for de kontroller, der anvendes i det pågældende laboratorium. Kontrollens middelværdi skal ligge inden for det accepterede område, der er fastsat af Aidian. Det tilrådes at bruge mindst to forskellige kitlot-numre til kontrolværditildeling. Når kontrolområderne er fastsat, skal kontrollerne køres in duplo med hver analyse.

9. BEREGNING AF RESULTATER

Til automatisk beregning af resultater anbefales en "spline funktionskurve tilpasning". Resultaterne kan også beregnes manuelt på semi-logaritmisk papir.

- **Beregn** middelværdien for alle kontroller, prøver og kalibratorer.
- **Beregn** % B/B₀ fra:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Kalibrator eller prøve counts} - \text{NSB}}{\text{0-kalibrator counts} - \text{NSB}} \times 100$$

hvor B er den bundne radioaktivitet for en prøve eller kalibrator, B₀ er den bundne aktivitet for kalibrator 0 og NSB for radioaktiviteten for ikke specifik binding

- **Tegn** en kalibreringskurve på semi-logaritmisk papir med % B/B₀ værdierne på ordinaten og PINP koncentrationer (µg/l) af kalibratorerne på abscissen.
- **Aflæs** PINP koncentrationen af de ukendte fra kalibreringskurven.

- Ethvert prøveresultat lavere end den laveste kalibrering, skal rapporteres som sådan.
- Ethvert prøveresultat højere end den højeste kalibrator, skal fortyndes og analyseres igen. Efter fortynding skal værdierne korrigeres for fortyndingsfaktoren.

Fig. 1 Typisk kalibreringskurve.
Eksempel.

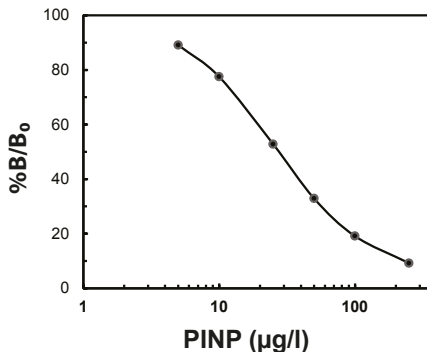


Table 1 Beregning af resultater ved typiske data.
Eksempel.

Rør	MW-cpm	cpm-NSB	%B/B ₀	PINP (µg/l)
Total	50970			
NSB	845			
Kal. 0	28330	27485		
Kal. 5	25343	24498	89.1	
Kal. 10	22143	21289	77.5	
Kal. 25	15344	14499	52.8	
Kal. 50	9897	9052	32.9	
Kal. 100	6095	5250	19.1	
Kal. 250	3379	2534	9.2	
Ukendt 1	10725	9880	35.9	44.6
Ukendt 2	4572	3727	13.6	157

10. PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Resultaterne af denne analyse skal sammen med andre relevante kliniske oplysninger bruges til at træffe diagnostiske og behandlingsmæssige beslutninger. Det anbefales derfor ikke at bruge UniQ PINP-analysen som screening-procedure til at påvise osteoporose i befolkningen som helhed.

Ved evaluering af efterfølgende prøver skal prøverne udtages på samme tidspunkt på dagen, da der forekommer døgnvariationer af PINP, hvor værdierne er højere om natten.

Type I collagen syntetiseres også af fibroblaster og kan derfor også forekomme i løst bindevæv sammen med andre collagentyper. Da knoglerne udgør det største collagene organ og også er metabolisk aktive livet igennem, er størstedelen af det cirkulerende PINP af osteoblastisk oprindelse.²⁵ PINP metaboliseres i leveren.²⁶ Svær leversygdom kan påvirke clearance fra blodkredsløbet og medføre forhøjede PINP-niveauer i serum.²⁷

Som det er tilfældet med de fleste analyser, der omfatter sekundære antistoffer, kan prøver indeholdende antistoffer (f.eks. heterofile antistoffer), der reagerer på IgG fra kaniner eller geder give fejlagtige resultater.

11. REFERENCEBEGRÆNSNINGER

Som følge af etniske-, kostrelaterede- og aldersvariationer vil det opgivne referenceniveau ikke gælde for alle populationer. Derfor bør alle laboratorier etablere deres egne referenceniveauer.

PINP værdier fra formodentlig raske voksne (19–65 år) er målt med UniQ PINP kittet. Til at kalkulere referenceintervallet for den øvre og nedre grænse er den af IFCC anbefalede "non-parametriske metode" anvendt.²⁸

Hvert laboratorium bør etablere sine egne repræsentative forventede værdier for den lokale population.

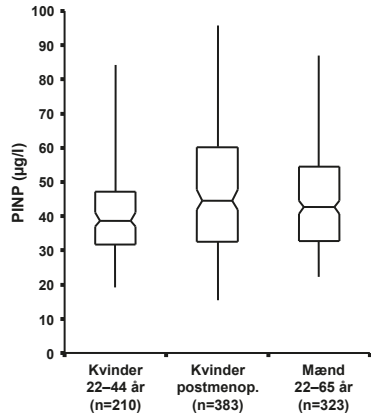
Tabel 2 Serum PINP referencegrænser

	Kvinder	Kvinder Postmenopausal *	Mænd
Alder, år	25–44	52–62	22–65
Antal patientprøver	210	383	323
Middelværdi	42 µg/l	48 µg/l	45 µg/l
Median	39 µg/l	45 µg/l	43 µg/l
Referenceinterval**	19–83 µg/l	16–96 µg/l	22–87 µg/l
0,95-konfidensintervaller			
for nedre referencegrænse	14–23 µg/l	15–19 µg/l	20–25 µg/l
for øvre referencegrænse	71–96 µg/l	87–103 µg/l	77–94 µg/l

*Min. 3 års postmenopausal

**Referenceinterval = 0.025 & 0.975 fraktiler

Fig. 2 Box-whisker-plots af distributionen af PINP-koncentrationer hos tilsyneladende raske voksne. Den vandrette linje i hver boks repræsenterer medianværdien, mens boksenes øverste og nederste afgrænsning angiver de interkvartile områder, dvs. værdier, der ligger 25 % over eller under medianværdien. Spidserne af "knurhårene" (whiskers) viser referenceområdets grænser (0,025 og 0,975 fraktiler).



De ovenfor anførte resultater viser, at PINP-koncentrationerne i en population af postmenopausale kvinder er forhøjede i forhold til koncentrationerne hos kvinder i aldersgruppen 25–44 år ($p = 0,0005$, Mann Whitney). De forhøjede PINP-koncentrationer afspejler den øgede knogleremodellering, der er forbundet med østrogenmangel i en postmenopausal population sammenlignet med en yngre population. Der er dog betydelige overlapninger i PINP-koncentrationerne i de to populationer.

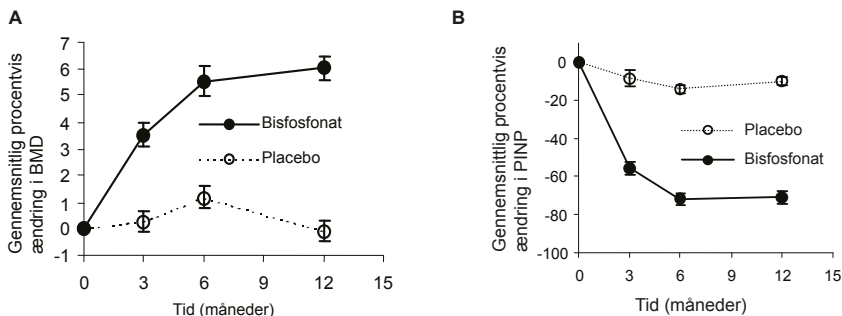
Behandling med bisfosfonat

Anvendeligheden af UniQ PINP RIA til overvågning af knogleremodelleringsændringer under behandling med bisfosfonat (10 mg alendronat dagligt) er undersøgt i en prospektiv, dobbeltblind placebokontrolleret multicenterundersøgelse af postmenopausale kvinder i den amerikanske befolkning med påvist osteoporose mindst 5 år efter menopause.²⁹ Der forelå data fra 124 patienter randomiseret til to grupper: 62, der fik behandling (TRM), og 62, der fik placebo (CTR). Alle deltagere i undersøgelsen fik kalciumtilskud på 500 mg/d. Patienterne blev analyseret ved baseline og efter 3, 6 og 12 måneders behandling. Knoglemineraltætheden (BMD) blev målt ved hjælp af DXA-scanning (dual-energy x-ray absorptiometry), og intakt PINP blev målt ved hjælp af UniQ PINP RIA. Dataene er vist i tabel 3 og figur 3. Ved baseline var BMD 0,740 ± 0,083 g/cm2 (middelværdi ± SD) i CTR-gruppen og 0,727 ± 0,104 g/cm2 i TRM-gruppen. I TRM-gruppen steg middel BMD med 6,0 % i forhold til baseline efter 12 måneder. Ændringen var signifikant på alle tidspunkter i forhold til baseline (p < 0,0001). Stigningen i CTR-gruppen var mindre og forbigående og vendte tilbage til baseline efter 12 måneder. Ved baseline var PINP-koncentrationen 62,5 ± 18,5 µg/l i CTR-gruppen og 61,1 ± 30,1 µg/l i TRM-gruppen. Middelkoncentrationen af PINP i TRM-gruppen faldt med 70,8 % efter 12 måneders behandling. Faldet var signifikant på alle tre tidspunkter (p < 0,0001) i forhold til baseline. Faldet i CTR-gruppen, der også fik kalciumtilskud, var mindre: 9,8 % efter 12 måneder. De observerede ændringer i BMD og PINP under behandlingen med bisfosfonat afspejler denne behandlings effekt på knogleremodellering. Resultaterne var som forventet og svarede til tidligere rapporter, der har vist et væsentligt fald i PINP-niveauerne under behandling med bisfosfonat.^{11, 30–31}

Tabel 3 Respons som en gennemsnitlig procentvis ændring i BMD og PINP koncentration hos patienter i behandling med bisfosfonat eller placebo.

Test	Treatment group	Middelværdiens procentvise ændring (SD) fra baseline		
		3 måneder	6 måneder	12 måneder
BMD	Placebo	+0.3 (3.1)	+1.2 (3.3)	−0.1 (3.2)
	Bisfosfonat	+3.5 (3.2)	+5.1 (4.4)	+6.0 (3.3)
PINP	Placebo	−8.6 (25.9)	−14.0 (25.5)	−9.8 (27.4)
	Bisfosfonat	−55.4 (34.0)	−71.6 (15.6)	−70.8 (15.5)

Fig. 3 Respons som en gennemsnitlig procentvis ændring ($\pm$ SE søjler) i (A) BMD og (B) PINP koncentration hos patienter i behandling med bisfosfonat (●) eller placebo (○).



For at have klinisk signifikans skal den procentvise ændring mellem de to målinger være større end både den analytiske (CV_a) og intraindividuelle (CV_i) variation. Grænsen, der kaldes den mindste procentvise ændring, kan beregnes på følgende måde:

$$\text{Mindste procentvise ændring} = \sqrt{2} \times 1.96 \times \sqrt{(CV_i^2 + CV_a^2)}$$

Der er offentliggjort flere værdier for PINP i litteraturen, f.eks. har Hannon m.fl. 12 rapporteret en mindste procentvis ændring på 21 % for PINP.

Hormonsubstitutionsbehandling

UniQ PINP RIAs evne til at afspejle knogleremodelleringsændringer under hormonsubstitutionsbehandling (HRT) af postmenopausale kvinder er undersøgt i en randomiseret, dobbeltblind doseringsundersøgelse.³²⁻³³ Deltagerne i undersøgelsen var tilsyneladende raske finske kvinder mindst 3 år efter menopause. Der forelå data fra behandlingsgruppen af 44 deltagere, der fik behandlingens laveste dosis: 1 mg peroralt østradiolvalerat og 2,5 mg peroralt medroxyprogesteronacetat dagligt. Patienterne blev analyseret ved baseline og efter 6 og 12 måneders behandling. BMD blev målt ved hjælp af DXA-scanning (dual-energy x-ray absorptiometry), og intakt PINP blev målt ved hjælp af UniQ PINP RIA.

Dataene er vist i tabel 4 og figur 4. Ved baseline var BMD $1,083 \pm 0,182$ g/cm² (middel $\pm$ SD), og koncentrationen af PINP var $42,2 \pm 15,3$ µg/l.

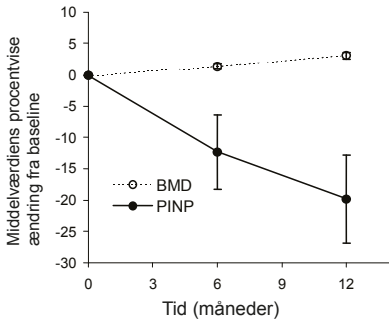
Efter 6 måneder var BMD steget med gennemsnitligt 1,4 %, og efter 12 måneder var stigningen 3,1 % i forhold til baselineværdien. PINP faldt i forhold til baselineværdien med 12,3 % efter 6 måneder og med 19,8 % efter 12 måneder. Ændringerne i BMD og PINP var signifikante ($p < 0,002$) på begge tidspunkter i forhold til baselineværdien.

De observerede ændringer i BMD og intakt PINP under HRT afspejler denne behandlings effekt på knogleremodellering selv ved denne undersøgelses behandling med lave doser. Resultaterne var som forventet og svarede til tidligere rapporter, der alle viste signifikante fald i PINP-niveauerne under forskellige HRT-behandlinger.^{12-13, 15}

Tabel 4 Reaktion som gennemsnitlig procentvis ændring i BMD- og PINP-koncentrationen hos postmenopausale patienter, der får HRT-behandling med lave doser.

Test	Middelværdiens procentvise afgivelse (SD) fra baseline-værdien	
	6 måneder	12 måneder
BMD	+1.4 (2.3)	+3.1 (3.8)
PINP	-12.3 (39.4)	-19.8 (46.5)

Fig. 4 Reaktion som gennemsnitlig procentvis ændring ($\pm$ standardfejlinjer) i BMD- (○) og PINP-koncentrationen (●) hos postmenopausale kvinder, der får HRT-behandling med lave doser.



Behandling med teriparatid

Teriparatid, humant parathyroideahormon [PTH] 1–34, af rekombinant DNA-oprindelse, stimulerer knogledannelse. UniQTM PINP RIAs evne til at afspejle knogleremodelleringsændringer efter behandling med teriparatid i forbindelse med behandling af osteoporose er undersøgt i 19 kliniske centre i en randomiseret dobbeltblind undersøgelse.³⁴ Deltagerne i undersøgelsen var ambulante postmenopausale kvinder med påvist osteoporose mindst 5 år efter menopause. En undergruppe af deltagerne fik doser på 20 µg teriparatid én gang dagligt med daglige kalciumtilskud (1000 mg) og vitamin D (400–800 IU) under hele undersøgelsen. Retrospektivt blev der indsamlet data fra 62 patienter i alderen 64,9 ± 7,8 år (middel ± SD), der fik teriparatid, og for hvem der forelå et fuldt sæt BMD- og PINP-resultater på de planlagte prøvetidspunkter. BMD i columna lumbalis (L1–L4) blev målt hos alle patienter ved hjælp af DXA-scanning med udstyr af mærket Lunar eller Hologic ved baseline og efter 3, 6, 12 og 18 måneders behandling med teriparatid. Intakt PINP blev målt ved baseline og efter 1, 3, 6 og 12 måneders behandling ved hjælp af UniQTM PINP RIA-analyse.

Behandling med teriparatid medførte en middel BMD-stigning i hele undersøgelsesperioden med statistisk signifikante stigninger på alle tidspunkter ($p < 0,0001$) i forhold til baseline. Middel BMD steg med 0,025 g/cm² efter 3 måneder, 0,039 g/cm² efter 6 måneder, 0,061 g/cm² efter 12 måneder og 0,079 g/cm² efter 18 måneder.

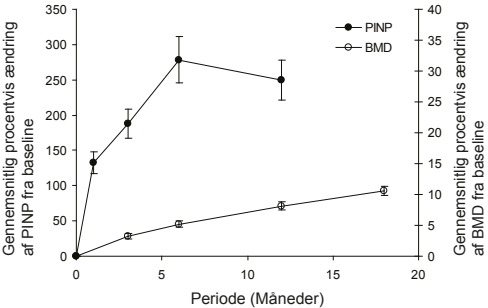
Middel PINP-koncentrationen steg med 59 µg/l i forhold til baseline efter 1 måned, 82 µg/l efter 3 måneder, 117 µg/l efter 6 måneder og 103 µg/l efter 12 måneder. Stigningen i PINP-koncentrationen i forhold til baseline var statistisk signifikant på alle tidspunkter ($p < 0,0001$).

Procentvis ændring i forhold til baseline for BMD og PINP blev beregnet på hvert tidspunkt. De gennemsnitlige procentvis ændringer er vist i tabel 5 og grafisk afbildet i figur 5. Middelværdierne for PINP og BMD steg som reaktion på behandlingen med teriparatid. PINP nåede toppunktet efter 6 måneder efterfulgt af et beskedent fald efter 12 måneder i forhold til målingen efter 6 måneder. Middel BMD steg som reaktion på behandling, idet den største værdi blev observeret ved slutningen af undersøgelsesperioden.

Tabel 5 Reaktion som gennemsnitlig procentvis ændring ($\pm$ SD) i BMD- og PINP-koncentrationen hos 62 postmenopausale kvinder med osteoporose, der får doser på 20 μ g teriparatid én gang dagligt.

Test	Ændring (MV $\pm$ SD)	Ændring (MV $\pm$ SD)	Ændring (MV $\pm$ SD)	Ændring (MV $\pm$ SD)	Ændring (MV $\pm$ SD)
	1 måned	3 måneder	6 måneder	12 måneder	18 måneder
BMD	NA	3.3 $\pm$ 3.4 %	5.2 $\pm$ 3.8 %	8.1 $\pm$ 5.1 %	10.6 $\pm$ 5.6 %
PINP	132.6 $\pm$ 118.2 %	187.8 $\pm$ 164.2 %	278.5 $\pm$ 257.1 %	249.5 $\pm$ 221.7 %	NA

Fig. 5 Reaktion som gennemsnitlig procentvis ændring ($\pm$ standardfejllinjer) i BMD- og PINP-koncentrationen hos 62 postmenopausale kvinder med osteoporose, der får doser på 20 μ g teriparatid én gang dagligt.



Observerede ændringer i BMD- og intakt PINP-niveauer afspejler den anaboliske effekt af behandlingen med teriparatid på knogleremodellering. Resultaterne var som forventet og svarede til andre rapporter, der har vist signifikante stigninger i PINP-niveauerne under behandling med teriparatid.^{17–20} Delvis baseret på samme kliniske materiale som ovenstående undersøgelse³⁴ er der udviklet en algoritme for anvendelse af PINP til overvågning af teriparatidbehandlede patienter, som understreger den kliniske værdi af PINP-målinger til behandling af postmenopausal osteoporose.²¹

12. KARAKTERISTISKE EGENSKABER

De nedenstående foreliggende resultater er opnået hos Aidian og gengiver typiske data.

Linearitet

Lineariteten af UniQ PINP RIA-analysen blev undersøgt ved fortynding af prøver med kittets 0 µg/l kalibrator. Genfindingsprocenten blev beregnet ved at dividere den målte koncentration med den forventede koncentration og gange med 100.

Tabel 6 PINP-analysens linearitet

Prøve	Fortynding	Forventet (µg/l)	Målt middelværdi (µg/l, n=4)	Beregnet for ufortyndet (µg/l)	Genfinding (%)
1	Neat	–	211.5	–	–
	4:5	169.2	153.3	191.6	91
	3:5	126.9	103.7	172.8	82
	2:5	84.6	76.6	191.5	91
	1:5	42.3	40.3	201.4	95
			MV	189.3	
			SD	12	
2	Neat	–	80.9	–	–
	4:5	64.7	64.5	80.6	100
	3:5	48.5	48.0	79.9	99
	2:5	32.4	33.0	82.4	102
	1:5	16.2	15.3	76.7	95
			MV	79.9	
			SD	2.4	
			CV %	3	

Præcision

Intra- og interanalysepræcisionen blev bestemt ved hjælp af serumpools og kontrolprøver indeholdende forskellige koncentrationer af PINP.

Tabel 7 Intra-assay / Inter-assay præcision

Intra-assay præcision med 18 / 20 gentagelser			Inter-assay præcision med 10 dobbeltbestemmelser		
Prøve	MV (µg/l)	CV (%)	Prøve	MV (µg/l)	CV (%)
1 (n=20)	26.6	5.4	5	26.0	5.5
2 (n=18)	33.1	3.2	6	32.9	8.3
3 (n=20)	53.1	5.4	7	52.7	9.5
4 (n=20)	149.2	9.6	8	142.9	8.9

Genfindning

Genfindingen blev undersøgt ved at tilsætte kendte mængder af oprenset PINP-antigen til en prøve indeholdende 19,1 µg/l endogent PINP. Prøven blev målt in duplo med UniQ PINP RIA-analysen, og genfindingsprocenten blev beregnet. Genfindingsprocenten er lig med stigningen i koncentrationen divideret med spikekoncentrationen og ganget med 100.

Tabel 8 PINP-analysens genfindning

Spike (µg/l)	Målt (µg/l)	Stigning (µg/l)	Genfindning (%)
–	19.1	–	–
109.0	120.0	100.9	93
68.8	87.8	68.7	100
41.3	59.1	40.1	97

Specifitet

UniQ PINP RIA-analysen af aktivt PINP er meget specifik for intakte trimeriske former af N-terminal propeptid af type I procollagen. De monomeriske nedbrydningsprodukter med lav molekylærvægt af PINP propeptid (Col1) påvises ved lave niveauer (2,7 % krydsreaktivitet). UniQ PINP RIA krydsreagerer ikke med N-terminal propeptid af type III procollagen (PIIINP).

Interferenser

Serumbilirubin koncentration < 400 µmol/l interfererer ikke. Serumhæmoglobin koncentrationer op til 5 g/l interfererer ikke. Triglycerid koncentrationer op til 30 g/l interfererer ikke.

Detektionsgrænse

UniQ PINP RIA-analysens detektionsgrænse blev bestemt ved at måle 20 gentagelser af 0 µg/l kalibratoren og kalibreringskurven (4 gentagelser) tre gange. Den mindste påviselige koncentration af PINP i analysen var på mindre end 2 µg/l, defineret som to gange standardafvigelsen for 0-bindingsværdien.

Måleområdet

The measurement range of the UniQ PINP RIA is 5–250 µg/l.

13. SPORBARHED

Målestørrelsen (analytten) i UniQ PINP RIA-kalibrаторer kan spores til producentens fungerende kalibrаторer, der er præpareret af højt oprenset PINP, hvis værdi tildeles ved at analysere sammensætningen af aminosyrer.

14. BORTSKAFFELSE

- Innholdet skal avhendes i samsvar med nasjonal og lokal lovgivning.
- Alle patientprøver, brukte kuvetter og hetteglas til prøvetagning skal håndteres og bortskaffes som potensielt smittefarligt materiale.
- Radioaktivt affald skal kasseres i henhold til gjældende lovgivning.
- Materiale i komponenterne:
 - Papir: Brugsanvisning
 - Karton: Æske til kittet
 - Plastic: Separationsreagensflasker, låg til flasker
 - Gummi: Stoppere
 - Glas: Tracer, antiserum, kalibrator, kontrollflasker
 - Skumgummi
- Hvis god laboratoriepraksis, gode hygiejnestandarder og brugsvejledningen følges, bør de medfølgende reagenser ikke udgøre en sundhedsrisiko.

Literature

1. **Melkko J et al.** Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 1996;42:947-954.
2. **Kress B et al.** Use of bone alkaline phosphatase to monitor alendronate therapy in individual postmenopausal osteoporotic women. *Clin Chem* 1999;45:1009-1017
3. **Rosenquist C et al.** Measurement of a more stable region of osteocalcin in serum by ELISA with two monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1995;41:1439-1445.
4. **Seibel M J.** Bone metabolism, mineral homeostasis and its pharmacological modulation. *Clin Lab* 2004;50:255-264.
5. **Cabrera DC et al.** Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1998;8:147-151.
6. **Saarto T et al.** Aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) correlates to bone loss and predicts the efficacy of antiresorptive therapy in pre- and post-menopausal non-metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer* 1998;78:240-245.
7. **Garnero P et al.** Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years: The OFELY study. *J Bone Miner Res* 1999;14:1614-1621.
8. **Scariano JK et al.** Diagnostic efficacy of serum cross-linked N-telopeptide (NTx) and aminoterminal procollagen extension peptide (PINP) measurements for identifying elderly women with decreased bone mineral density. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62:237-244.
9. **Scariano JK et al.** Serum levels of cross-linked N-telopeptides and aminoterminal propeptides of type I collagen indicate low bone mineral density in elderly women. *Bone* 1998;23:471-477.
10. **Garnero P et al.** Short-term effects of new synthetic conjugated estrogens on biochemical markers of bone turnover. *J Clin Pharmacol* 2002;42:290-296.
11. **Fink E et al.** Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporosis Int* 2000;11:295-303.
12. **Hannon R et al.** Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *J Bone Miner Res* 1998;13:1124-1133.
13. **Peris P et al.** Biochemical markers of bone turnover after surgical menopause and hormone replacement therapy. *Bone* 1999;25:349-353.
14. **Reginster J-Y et al.** Reduction in PINP, a marker of bone metabolism, with raloxifene treatment and its relationship with vertebral fracture risk. *Bone* 2004;34:344-351.
15. **Sharp CA et al.** Effects of low- and conventional-dose transcutaneous HRT over 2 years on bone metabolism in younger and older postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1996;26:763-771.
16. **Suvanto-Luukkonen E et al.** Comparison of three serum assays for bone collagen formation during postmenopausal estrogen-progestin therapy. *Clin Chim Acta* 1997;266:105-116.
17. **Black DM et al.** The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2003;349:1207-1215.
18. **Chen P et al.** Early changes in biochemical markers of bone formation predict BMD response to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2005;20:962-97.
19. **Deal C et al.** Combination teriparatide and raloxifene therapy for postmenopausal osteoporosis: results from a 6-month double-blind placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 2005;20:1905-1911.

20. **Ettinger B et al.** Differential effect of teriparatide on BMD after treatment with raloxifene and alendronate. *J Bone Miner Res* 2004;19:745-751.
21. **Eastell R et al.** Development of an algorithm for using PINP to monitor treatment of patients with teriparatide. *Curr Med Res Opin* 2006;22:61-66.
22. **Alvarez L et al.** Relationship between biochemical markers of bone turnover and bone scintigraphic indices in assessment of Paget's disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:461-468.
23. **Alvarez L et al.** Components of biological variation of biochemical markers of bone turnover in Paget's bone disease. *Bone* 2000;26:571-576.
24. **Pons F et al.** Quantitative evaluation of bone scintigraphy in the assessment of Paget's disease activity. *Nucl Med Comm* 1999;20:525-528.
25. **Risteli J and Risteli L.** Products of bone collagen metabolism. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (eds). *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. Academic Press, San Diego, 1999. p 275-287.
26. **Melkko J et al.** Clearance of the aminoterminal propeptides of types I and III procollagen is a physiological function of the scavenger receptor in liver endothelial cells. *J Exp Med* 1994;79:405-412.
27. **Naylor KE and Eastell R.** Measurement of biochemical markers of bone formation. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (eds). *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. Academic Press, San Diego, 1999. p 401-410.
28. **IFCC, EPTRV:** The theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:749-760.
29. **Liberman U et al.** Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;333:1437-1443.
30. **Stepan JJ and Vokrouhlicka J.** Comparison of biochemical markers of bone remodelling in the assessment of the effects of alendronate on bone in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chim Acta* 1999;288:121-135.
31. **Bauer DC et al.** Change in bone turnover and hip, non-spine, and vertebral fracture in alendronate-treated women: The Fracture Intervention Trial. *J Bone Miner Res* 2004;19:1250-1258.
32. **Heikkinen J et al.** Long-term continuous combined hormone replacement therapy in the prevention of postmenopausal bone loss: A comparison of high- and low-dose estrogen-progestin regimens. *Osteoporos Int* 2000;11:929-937.
33. **Heikkinen J et al.** Optimizing continuous-combined hormone replacement therapy for postmenopausal women: A comparison of six different treatment regimens. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:560-567.
34. **McClung M et al.** Opposite bone remodelling effects of teriparatide and alendronate in increasing bone mass. *Arch Inter Med* 2005;165:1762-1768.
35. **Crofton PM et al.** Procollagen type I amino-terminal propeptide: Pediatric reference data and relationship with procollagen type I carboxy-terminal propeptide. *Clin Chem* 2004;11:2173-2176.

UniQ[®] is a registered trademark of Aidian Oy.



AIDIAN

Aidian Oy
Koivu-Mankkaan tie 6 B, FI-02200 Espoo, Finland
P.O. Box 83, FI-02101 Espoo, Finland
+358 10 309 3000, aidian.eu

