

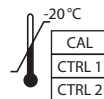
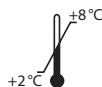
Hydroxy-Pyridinium-Crosslinks HPLC Kit

Zur Bestimmung der Hydroxy-Pyridinium-Crosslinks in Urin
For the determination of hydroxy-pyridinium crosslinks in urine

Gültig ab / Valid from 2015-08-31



KC3201



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Hinweise</i>	6
<i>Hydrolyse der Proben</i>	6
<i>Arbeitsschema</i>	6
<i>Chromatographische Bedingungen</i>	7
10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE	7
11. AUSWERTUNG	7
<i>Musterchromatogramm</i>	8
12. EINSCHRÄNKUNGEN	8
13. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzbereich</i>	8
<i>Kontrollen</i>	8
14. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Linearität</i>	9
<i>Nachweisgrenze</i>	9
<i>Wiederfindung</i>	9
15. ENTSORGUNG	9
16. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN	10
17. LITERATUR	11
18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Diese HPLC-Applikation ist für die Bestimmung von Pyridinolin und Desoxypyridinolin aus Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die Pyridinium-Derivate Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) werden als Quervernetzungsprodukte („Crosslinks“) während der Bildung der Kollagenfibrillen gebildet und sind so für die Stabilität des Kollagens verantwortlich. Während der Knochenresorption werden die ausgereiften Matrix-Kollagene proteolytisch degradiert, wodurch die quervernetzenden Substanzen freigesetzt werden. Da sowohl PYD als auch DPD vom Körper nicht weiterverwendet werden, erfolgt eine Ausscheidung im Urin. Crosslinks sind aufgrund ihrer natürlichen Fluoreszenz mittels HPLC hochspezifisch und hochsensitiv im Urin nachzuweisen. Die Messung der Hydroxypyridinoline mit der HPLC bietet folgende Vorteile:

- Im Gegensatz zum Hydroxyprolin werden sie nicht von der Neubildung von Kollagenen beeinflusst, sodass eine absolute Spezifität für resorptive Prozesse besteht.
- Da weder PYD noch DPD mit der Nahrung aufgenommen werden, kann die Bestimmung der Crosslinks im Urin unabhängig vom Ernährungsstatus erfolgen.
- Eine Störung durch eine Niereninsuffizienz erfolgt erst ab GFR < 20 ml/min.
- Diese Bestimmung der Pyridinoline ist sensitiver als die Bestimmung von Hydroxyprolin.
- Die Bestimmung mittels HPLC ist sensitiver als herkömmliche Immunassays.
- Mittels unserer HPLC-Methode wird das gesamte PYD und DPD in einem Lauf gemessen. Dies ist natürlich nur möglich, hier liegt die besondere klinische Wertigkeit der HPLC-Applikation, wenn die Proben mittels Hydrolyse aufbereitet werden. Im Gegensatz dazu können die Immunassays hier nicht differenzieren. Es müssen immer zwei Assays durchgeführt werden und die durch peptidgebundenes PYD und DPD hervorgerufenen Matrixeffekte können mangels Probenvorbereitung nicht kalkuliert werden.
- Die Ratio von DPD und PYD gibt einen genaueren Aufschluss über den Abbauort.

- Die Messung zeichnet sich für das skelettale Gewebe aus: während PYD in Knorpel, Sehnen und Bändern vorkommt, findet sich DPD fast ausschließlich im Knochen.
- Aufgrund der Kombination aus hoher Prozess- und Gewebespezifität wird die Bestimmung von DPD im Urin mittels HPLC als die derzeit beste Methode zur Bestimmung der Knochenresorptionsrate angesehen.

3. TESTPRINZIP

Zur Bestimmung der Hydroxy-Pyridinium-Crosslinks wird im ersten Schritt eine Probenvorbereitung mittels Hydrolyse und einer anschließenden Adsorptionschromatographie an Cellulose durchgeführt. Die eluierten Pyridinium-Crosslinks werden in das HPLC-System injiziert.

Die Trennung mittels HPLC erfolgt in einem isokratischen Verfahren bei 30 °C auf einer „reversed phase“-Säule. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgt mit einem Fluoreszenzdetektor. Die Trennung benötigt ca. 20 Minuten für einen Lauf und die Berechnung der Ergebnisse erfolgt mittels des mitgeführten Kalibrators über die Integration der Peakfläche nach der externen Standardmethode.

Zusammenfassung

Der hier vorliegende Komplettkit zur Bestimmung der Hydroxy-Pyridinium-Crosslinks ermöglicht eine überaus präzise quantitative Bestimmung. Dieser Komplettkit enthält alle Reagenzien für die analytische HPLC-Trennung sowie bis auf die unbegrenzt wiederverwendbaren Probenvorbereitungssäulen (einmalige Anschaffung) auch alle Reagenzien für die Probenextraktion.

Wie auch bei vielen anderen Parametern liegt der Vorteil der HPLC-Analytik in der gleichzeitigen Abarbeitung mehrerer Analyten in einem Test. Die HPLC-System-Komplettlösung ermöglicht auch Laboratorien, die bislang noch keine Erfahrung mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie haben, diese Technik schnell und problemlos für klinisch-chemische Routinezwecke einzusetzen. Für die Kalibrierung des Testsystems ist meist eine Einpunkt-Kalibrierung ausreichend, im Gegensatz zu Immunoassays, die bis zu 6 Kalibratoren pro Testansatz erfordern. Eine Automatisierung der Probenaufgabe und der Auswertung ist möglich, sodass auch größere Probenzahlen fast unbeaufsichtigt abgearbeitet werden können. Bei kurzen Serienlängen ist die Einpunktkalibrierung sehr viel wirtschaftlicher gegenüber der 6-Punkt-Kalibrierung bei Immunoassays.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KC3201LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KC3201KA	CAL	Kalibrator (lyoph. 5,5 ml; Konzentration siehe Etikett)	3 Fläschchen
KC3201HY	HYDREA	Hydrolysereagenz	100 ml
KC3201W1	WASH1	Waschlösung I Reagenz I Reagenz II	3 x 280 ml 3 x 560 ml
KC3201W2	WASH2	Waschlösung II	50 ml
KC3201RB	REABUF	Reaktionspuffer Reagenz I Reagenz II	3 x 22 ml 3 x 88 ml
KC3201EL	ELUSOL	Elutionslösung	50 ml
KC3201CS	CELLULOSE	Cellulose (4 g)	3 Fläschchen
KC3201KO	CTRL1 CTRL2	Kontrolle 1 und 2 (lyoph. 2,2 ml; Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 x 3 Fläschchen

Die HPLC Trennsäule (KC3201RP) kann separat bei Immundiagnostik bestellt werden. Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Glasröhrchen zur Hydrolyse (dunkel, verschweißbar), oder Pyrex-Röhrchen mit Teflon-Schraubverschluss (Bezug über Immundiagnostik möglich)
- HPLC-Anlage (isokratisch) mit Fluoreszenz-Detektor
- „reversed phase“ C18-Säule, 4 µm, 125 × 4 mm
- Absaugeinheit für Festphasenextraktionskartuschen
- Chromatographiekartuschen mit Fritte od. Glaswolle

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Vorbereitung des Kalibrators und der Kontrollen

Der **Kalibrator** (CAL, Urin mit definierter Menge Pyridinolin und Desoxypyridinolin) wird mit 5,5 ml Reinstwasser rekonstituiert. Anschließend wird er aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. Der Gehalt der beiden Crosslinks ändert sich geringfügig von Charge zu Charge, der genaue Gehalt ist auf dem Etikett angegeben.

Die **Kontrollen** (CTRL 1, CTRL2) werden in 2,2 ml Reinstwasser resuspendiert.

Alle Testreagenzien sind bei 20–25 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar. Der Kalibrator (CAL) ist bei -20 °C zu lagern.

Herstellung des Reaktionspuffers

Der gesamte Inhalt der Flasche Reaktionspuffer (REABUF) **Reagenz I** wird in die Flasche des Reaktionspuffer (REABUF) **Reagenz II** gegeben, gemischt und 12 Stunden bei 20–25 °C inkubiert. Der frisch hergestellte Reaktionspuffer ist 3 Monate stabil.

Herstellung der Waschlösung I

Der gesamte Inhalt der Flasche Waschlösung I (WASH1) **Reagenz I** wird in die Flasche der Waschlösung I (WASH1) **Reagenz II** gegeben, gemischt und 12 Stunden bei 20–25 °C inkubiert. Die frisch hergestellte Waschlösung I ist 3 Monate stabil.

Herstellung des Cellulose-Slurry

Zu 4g Cellulose (CELLULOSE) werden 40ml Waschlösung I gegeben und gut gemischt. Der frisch hergestellte Cellulose-Slurry ist einen Monat haltbar.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Kalibrator (CAL) und Kontrollen (CTRL1, CTRL2) sind aus Humanurin hergestellt. Sie sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Das Hydrolysereagenz (HYDREA) besteht aus Säure und muss mit Vorsicht behandelt werden. Sie verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Als Patientenprobe eignet sich Urin. Ein zweistündiger Sammelurin, abgenommen zwischen 7⁰⁰ und 10⁰⁰ Uhr morgens korreliert gut mit einem 24-Stunden-Sammelurin. Die Urinproben sind bei 20–25 °C für 24 Stunden, bei 2–8 °C für eine Woche stabil. Eine längere Lagerung sollte bei -20 °C erfolgen.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Hydrolyse der Proben

Patientenurin, Kalibrator (CAL) und Kontrollen (CTRL1, CTRL2) werden 1+1 (1 ml +1 ml) Hydrolysereagenz (HYDREA) versetzt und 4 Stunden bei 120 °C hydrolysiert.

Vorsicht: Das Hydrolysereagenz (HYDREA) besteht aus konzentrierter Salzsäure und ist ätzend.

Arbeitsschema

1.	Kartusche mit 1 ml Cellulose-Slurry füllen. Der Slurry muss gut gemischt werden, sodass die Säulen homogen gepackt werden.
2.	5 ml Waschlösung I durch die Säule saugen.
3.	Probenmischung vorbereiten: 0,5 ml Waschlösung I, 0,5 ml hydrolysiertes kalter Urin und 3 ml Reaktionspuffer mischen, auf die Säule geben und mit mäßigem Unterdruck durch die Säule saugen.
4.	Säule mit 2 x 8 ml Waschlösung I waschen.
5.	10 min unter Vakuum trocknen.

6.	Säule mit 0,5 ml Waschlösung II waschen.
7.	10 min unter Vakuum trocknen.
8.	Probe mit 0,5 ml Elutionslösung (ELUSOL) eluieren.
9.	Probe zentrifugieren und 100 µl injizieren.

Chromatographische Bedingungen

Säulenmaterial:	Superspher RP18, 4 µm
Säulendimension:	125 × 4 mm
Fluss:	1,0–1,5 ml/min
Fluoreszenzdetektion:	Extinktion: 290 nm Emission: 400 nm
Temperatur:	30 °C
Auftragsvolumen:	100 µl
Laufzeit:	ca. 20 Minuten

10. BEHANDLUNG DER TRENNSÄULE

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 30 ml Reinstwasser bei einem Fluss von 1 ml/min gespült werden. Anschließend wird die Säule in 50 % Methanol in Wasser gelagert (ca. 30 ml, Fluss 0,7 ml/min).

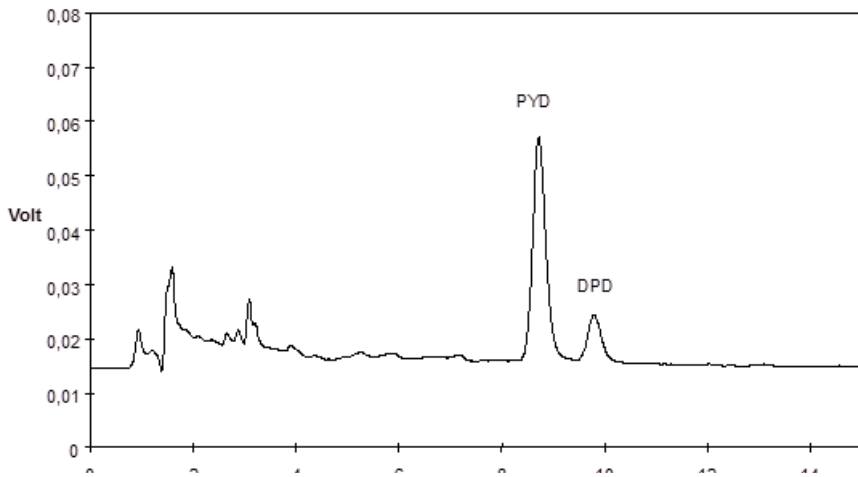
Zur Wiederinbetriebnahme wird das ganze System mit ca. 30 ml Laufmittel (MOPHA) äquilibriert.

11. AUSWERTUNG

$$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration Kalibrator (pmol/ml)}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}} = \text{Konzentr. Probe (pmol/ml)}$$

Tipp: Alternativ zur Peakhöhe kann auch die Peakfläche zur Quantifizierung verwendet werden.

Musterchromatogramm



12. EINSCHRÄNKUNGEN

Serum, Plasma oder Vollblutproben können nicht verwendet werden.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Referenzbereich

$38,4 \pm 18,4$ nmol PYD/mmol Kreatinin

$10,3 \pm 5,3$ nmol DPD/mmol Kreatinin

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, da Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

Kontrollen

Zur Überwachung der Qualität der Analyse sollten bei jedem Lauf Kontrollen mitgeführt werden. Wenn eine oder mehrere Kontrollen eines Laufs außerhalb ihres Bereichs liegen, ist es möglich, dass auch die Patientenproben falsch ermittelt wurden.

14. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay VK:

PYD:	4,5 % (958 pmol/ml)	[n = 10]
DPD:	6,2 % (238 pmol/ml)	[n = 10]

Inter-Assay VK:

PYD:	8,9 % (1051 pmol/ml)	[n = 10]
PYD:	7,9 % (177 pmol/ml)	[n = 10]
DPD:	8,6 % (254 pmol/ml)	[n = 10]
DPD:	8,2 % (45 pmol/ml)	[n = 10]

Linearität

PYD:	bis 2500 µmol/ml
DPD:	bis 1000 µmol/ml

Nachweisgrenze

7,3 pmol/ml

Wiederfindung

PYD	97.4 %
DPD	94.4 %

15. ENTSORGUNG

Das Laufmittel (MOPHA), Waschlösung I und II (WASH1, WASH2), Reaktionspuffer (REABUF) und Elutionslösung (ELUSOL), müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Das Hydrolysereagenz (HYDREA) kann mit Natronlauge neutralisiert und bei neutralem pH als Salzlösung entsorgt werden.

Achtung: extreme Wärmeentstehung!

16. MASSNAHMEN BEI STÖRUNGEN

Problemstellung	Mögliche Ursache	Behebung
Kein Signal	Keine oder defekte Verbindung zur Auswerteeinheit.	Signalkabel und Anschluss prüfen.
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
Keine Peaks	Injektor verstopft	Injektor überprüfen
Doppelpeaks	Totvolumen an Fittings und / oder Säule	Fittings und / oder Säule erneuern
Störpeaks	Injektor verunreinigt	Injektor reinigen
	Kontamination am Säulenkopf	Säule umdrehen und 30 min mit niedrigem Fluss (0,2 ml/min) mit Laufmittel spülen
	Luft im System	Pumpe entgasen
	Autosamplergefäße verunreinigt	Neue oder mit Methanol gespülte Autosamplergefäße verwenden
Breite Peaks, Tailing	Vorsäule / Säule zu alt	Neue Vorsäule / Säule verwenden
Veränderte Retentionszeit	Temperaturdrift	Säulenofen verwenden
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
Basislinie driftet	Detektorlampe noch kalt	Warten
	Detektorlampe zu alt	Ggf. Lampe erneuern
	System noch nicht im Gleichgewicht	System mit mobiler Phase 15 min spülen
	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
Unruhige Basislinie	Pumpe fördert ungenau	Pumpe überprüfen, entlüften
	Detektorzelle verschmutzt	Detektorzelle reinigen

17. LITERATUR

1. Seibel, M.J., Robins, S.P. & Bilezikian, J.P., 1992. Urinary pyridinium crosslinks of collagen: Specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **3**(7), pp.263–270.
2. Robins, S.P. et al., 1991. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. *European journal of clinical investigation*, **21**(3), pp.310–315.
3. Seibel, M.J. et al., 1992. Urinary hydroxypyridinium cross-links of collagen in primary hyperparathyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **74**(3), pp.481–6.
4. Zittermann, A. et al., 2002. Oral contraceptives moderately effect bone resorption markers and serum-soluble interleukin-6 receptor concentrations. *Calcified tissue international*, **70**(1), pp.11–21.

18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Chargennummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis

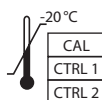
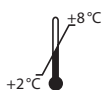
Hydroxy-Pyridinium-Crosslinks HPLC Kit

*For the determination of hydroxy-pyridinium crosslinks
in urine*

Gültig ab / Valid from 2015-08-31



KC3201



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE _____ 15

2. INTRODUCTION _____ 15

3. PRINCIPLE OF THE TEST _____ 15

4. MATERIAL SUPPLIED _____ 16

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED _____ 16

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS _____ 17

7. PRECAUTIONS _____ 17

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION _____ 18

9. ASSAY PROCEDURE _____ 18

Procedural notes _____ 18

Sample hydrolysis _____ 18

Test procedure _____ 18

Chromatographic conditions _____ 19

10. TREATMENT OF THE COLUMN _____ 19

11. RESULTS _____ 19

Typical chromatogram _____ 20

12. LIMITATIONS _____ 20

13. QUALITY CONTROL _____ 20

Expected values _____ 20

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS _____ 21

Precision and reproducibility _____ 21

Linearity _____ 21

Detection limit _____ 21

Recovery _____ 21

15. DISPOSAL _____ 21

16. TROUBLESHOOTING _____ 22

17. REFERENCES _____ 23

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE _____ 23

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik assay is intended for the quantitative determination of pyridinoline und deoxypyridinoline in urine. This assay is designed for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

The hydroxypyridinium compounds pyridinoline (PYD) and deoxypyridinoline (DPD) are specific constituents of mature skeletal collagens. They are released into the circulation and excreted in the urine. Their measurement in urine is a sensitive index of the extent of ongoing bone resorption. The quantification of collagen crosslinks in urine is achieved by chromatographic techniques.

Clinical applications of hydroxypyridinium markers include numerous metabolic bone disorders such as osteoporosis, primary hyperparathyroidism, Paget's disease of bone, and metastatic bone disease. Urinary pyridinium crosslinks of collagen also show great promise as markers of therapeutic efficacy in bone disorders associated with accelerated bone resorption.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The first step in determining the hydroxy-pyridinium crosslinks is a hydrolysis of the sample followed by a solid phase extraction on cellulose cartridges. 100 µl of the eluate are injected into the HPLC system.

The separation via HPLC follows an isocratic method at 30 °C using a reversed phase column. One run lasts 20 minutes. The chromatograms are recorded by a fluorescence detector. The quantification is performed with the delivered urine calibrator; the concentration is calculated via integration of the peak areas by the external standard method.

Summary

Besides many other parameters, the advantage of HPLC method lies in the simultaneous handling of many analytes in a single test. The HPLC system enables even laboratories without experience in high performance liquid chromatography to use this technique for clinical routine determination in a quick and precise manner. Unlike immunoassays with up to six calibrators per test, a one-point calibration is mostly sufficient to calibrate the test system. It is possible to automate the sample application and calculation of the results so that even higher sample numbers can be handled nearly without control.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KC3201LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KC3201KA	CAL	Calibrator, lyophilized	3 vials
KC3201HY	HYDREA	Hydrolysis reagent	100 ml
KC3201CS	CELLULOSE	Cellulose	3 x 4 g
KC3201RB	REABUF	Reaction buffer Reagent I Reagent II	3 x 22 ml 3 x 88 ml
KC3201W1	WASH1	Washing solution I Reagent I Reagent II	3 x 280 ml 3 x 560 ml
KC3201W2	WASH2	Washing solution II	50 ml
KC3201EL	ELUSOL	Elution solution	50 ml
KC3201KO	CTRL1 CTRL2	Control 1 and 2; 2.2 ml lyophilized	2 x 3 vials

The HPLC column (KC 3201RP) as well as individual components can be ordered separately from Immundiagnostik. Please ask for the price list of the individual components.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Glass tubes for hydrolysis (dark, heat-sealable)
- Vacuum chamber for solid phase extraction
- HPLC-pump (isocratic) with an Fluorescence-detector
- Superspher RP18-column, 4 µm, 125 × 4 mm
- Cryostat or heating block
- Chromatographic-cartridges with discs or glass wool

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

Preparation of the calibrator and controls

Reconstitute the calibrator (CAL; urine spiked with defined amounts of pyridinoline and desoxypyridinoline) in 5.5 ml ultra pure water. Divide the calibrator (CAL) in several aliquots and store them at -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. The contents of pyridinium and desoxypyridinium crosslinks slightly change from lot to lot. The exact content is given on the label.

Reconstitute the controls (CTRL1, CTRL2) in 2.2 ml ultra pure water.

All other test reagents are stable at 20–25 °C, up to the date of expiry stated on the label.

Preparation of the reaction buffer

Add the total content of reaction buffer (REABUF) reagent I to the bottle of reaction buffer (REABUF) reagent II and incubate the mixture for 12 hours at room temperature. The freshly prepared reaction buffer is stable for 3 months.

Preparation of washing solution I

Add the total content of washing solution I (WASH1) reagent I to the bottle of washing solution (WASH1) reagent II and incubate the mixture for 12 hours at room temperature. The freshly prepared washing solution I is stable for 3 months.

Preparation of the cellulose slurry

Add 40 ml of washing solution I to 4 g cellulose (CELLULOSE) and mix well. The freshly prepared cellulose slurry is stable for 1 month.

7. PRECAUTIONS

- This product contains human source material which was tested and found to be non-reactive to HBsAg, anti-HIV-1/2, and anti-HCV. Since no method can offer complete assurance that hepatitis B virus, HIV-1/2, HVC or other infectious agents are absent, these reagents should nevertheless be handled as if potentially infectious.
- The hydrolysis reagent (HYDREA), reaction buffer (REABUF) and washing solution I (WASH1) contain acid. Although diluted, they still must be handled with care. They can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapors and avoid inhalation.

- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Urine is suited for this test system. A two hour urine sampling between 7⁰⁰ and 10⁰⁰am correlates well with a 24 h collection. Samples are stable for 24 h at room temperature and up to one week at 2–8 °C. Longer storage should be at -20 °C.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Sample hydrolysis

Patient urine, calibrator (CAL) or controls (CTRL1, CTRL2) should be diluted 1+1 (1 ml + 1 ml) with hydrolysis reagent (HYDREA) and hydrolysed for 4 hours at 120 °C.

Caution: HYDREA consists of concentrated hydrochloride acid.

Test procedure

1.	Fill up the column with 1 ml cellulose slurry. Mix the slurry carefully so that the column is packed homogeneously.
2.	Soak 5 ml washing solution I through the column by vacuum.
3.	Mix 0.5 ml washing solution I, 0.5 ml hydrolyzed cold urine and 3 ml reaction buffer. Shake very well, pipet onto the column and let it being soaked through by vacuum.
4.	Rinse the column with 2 x 8 ml washing solution I by vacuum.
5.	Dry the column by vacuum for 10 min.

6.	Rinse the column with 0.5 ml washing solution II (WASH2) by vacuum.
7.	Dry the column by vacuum for 10 min.
8.	Elute the sample with 0.5 ml elution solution (ELUSOL) by vacuum.
9.	Centrifuge the sample and inject 100 µl into the HPLC system.

Chromatographic conditions

Column material: Merck Supersher, 4 µm

Column dimension: 125 × 4 mm

Flow rate: 1–1.5 ml/min

Temperature: 30 °C

Fluorescence de- Excitation 290 nm
tection: Emission 400 nm

Injection volume: 100 µl

Running time / chromatogram: 20 minutes

10. TREATMENT OF THE COLUMN

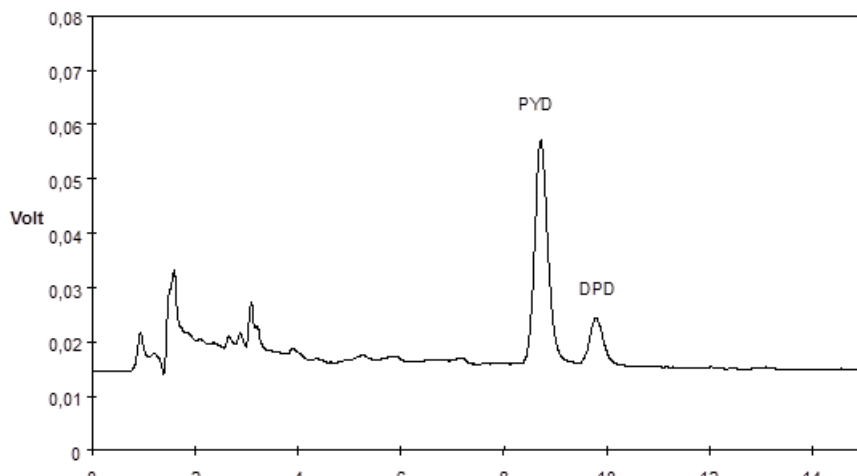
After analysis the column should be flushed with 30 ml ultra pure water (1 ml/min) and stored in 50 % methanol in ultra pure water (approx. 30 ml, flow 0.7 ml/min). Before use, the system should be equilibrated with ca. 30 ml eluent.

11. RESULTS

$$\frac{\text{Peak height sample} \times \text{calibrator concentration (pmol/ml)}}{\text{Peak height calibrator}} = \text{sample conc. (pmol/ml)}$$

Tip: Alternatively, the peak area instead of the peak height can be used for quantification.

Typical chromatogram



12. LIMITATIONS

Don't use serum, plasma or whole blood.

13. QUALITY CONTROL

Expected values

38.4 ± 18.4 nmol PYD/mmol creatinine

10.3 ± 5.3 nmol DPD/mmol creatinine

We recommend each laboratory to establish its own reference range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

Controls

Control samples or urine pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV

PYD	4.5 % (958 pmol/ml)	[n = 10]
DPD	6.2 % (238 pmol/ml)	[n = 10]

Inter-Assay CV

PYD	8.9 % (1051 pmol/ml)	[n = 10]
PYD	7.9 % (177 pmol/ml)	[n = 10]
DPD	8.6 % (254 pmol/ml)	[n = 10]
DPD	8.2 % (45 pmol/ml)	[n = 10]

Linearity

PYD	up to 2500 pmol/ml
DPD	up to 1000 pmol/ml

Detection limit

PYD	7.3 pmol/ml
PYD	7.3 pmol/ml

Recovery

PYD	97.4 %
DPD	94.4 %

15. DISPOSAL

The mobile phase (MOPHA), washing solution I and II (WASH1, WASH2), reaction buffer (REABUF) and elution solution (ELUSOL) must be disposed as non-halogenated solvent. The hydrolysis solution (HYDREA) can be neutralized with NaOH. If the pH value is neutral, it can be disposed as salt solution.

Important: Reaction will produce extreme heat, be careful!

Please refer to the appropriate national guidelines.

16. TROUBLESHOOTING

Problem	Possible reason	Solution
No signal	No or defect connection to evaluation system	Check signal cord and connection
	Detector lamp is altered	Change lamp
No peaks	Injector is congested	Check Injector
Doublepeaks	Dead volume in fittings and / or column	Renew fittings and / or column
Contaminating peaks	Injector dirty	Clean injector
	Contamination at the head of the column	Change direction of the column and rinse for 30 min at low flow rate (0.2 ml/min) with mobile phase
	Air in the system	Degas pump
	Autosampler vials contaminated	Use new vials or clean them with methanol
Broad peaks, tailing	Precolumn / column exhausted	Use new precolumn / column
Variable retention times	Drift in temperature	Use a column oven
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
Baseline is drifting	Detector lamp did not yet reach working temperature	Wait
	Detector lamp is too old	Renew lamp
	System is not in steady state yet	Rinse system mobile phase for 15 min
	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system

Problem	Possible reason	Solution
Baseline is not smooth	Pump delivers imprecise	Check pump, degas the system
	Detector flow cell is dirty	Clean flow cell

17. REFERENCES

1. Seibel, M.J., Robins, S.P. & Bilezikian, J.P., 1992. Urinary pyridinium crosslinks of collagen: Specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **3**(7), pp.263–270.
2. Robins, S.P. et al., 1991. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. *European journal of clinical investigation*, **21**(3), pp.310–315.
3. Seibel, M.J. et al., 1992. Urinary hydroxypyridinium cross-links of collagen in primary hyperparathyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **74**(3), pp.481–6.
4. Zittermann, A. et al., 2002. Oral contraceptives moderately effect bone resorption markers and serum-soluble interleukin-6 receptor concentrations. *Calcified tissue international*, **70**(1), pp.11–21.

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the

test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by