

Ostase[®] BAP Immunoenzymetric Assay



For the quantitative measurement of
Bone-specific Alkaline Phosphatase (BAP) in human serum



INTENDED USE

The Ostase BAP Immunoenzymetric Assay is an *in vitro* device indicated for the quantitative measurement of bone-specific alkaline phosphatase (BAP), an indicator of osteoblastic activity, in human serum. This device is intended to be used as an aid in the management of postmenopausal osteoporosis and Paget's disease.

SUMMARY AND EXPLANATION

Bone is a dynamic tissue in which bone formation and bone removal (also referred to as resorption) continue throughout life in a process called remodeling. The remodeling process is a function of complex interactions between two types of bone cells: osteoblasts for the formation of bone, and osteoclasts for the resorption of bone (1-3). Bone formation and resorption are interdependent processes that are, under normal circumstances, tightly coupled (2,4). This coupled relationship is integral to maintaining the biochemical competence of the skeleton, thereby preserving the organization of bone structure, form, and strength (2,3,5).

Serum levels of BAP are believed to reflect the metabolic status of osteoblasts (6,7). An accurate assessment of bone metabolism is critical for determining the severity of metabolic bone disease and responses to therapy. Measurement of serum levels of BAP has been shown to be useful in evaluating patients with Paget's disease, osteomalacia, primary hyperparathyroidism, renal osteodystrophy, osteoporosis and metastases to bone (6-10). Total alkaline phosphatase determinations have been the accepted method for the diagnosis and monitoring of patients with Paget's disease.

Paget's disease of bone is a common skeletal disorder in which there is a focal proliferation of the normal cellular components of bone. Paget's disease is more prevalent than once thought with the incidence rate in certain populations at 3%-4% in middle-aged patients and 10%-15% in the elderly (11). This disease does not affect young individuals. The majority of patients with Paget's disease have no symptoms and often go undiagnosed unless an abnormal X-ray or serum alkaline phosphatase level is found in the course of a medical evaluation for unrelated reasons. The most common complaints in symptomatic patients are pain and deformity.

The risk of osteoporosis, another bone remodeling disorder, depends in part upon skeletal development, the attainment of peak bone mass, and in later life, the amount of bone lost. In healthy children, bone formation is favored over bone resorption, which results in bone development and normal skeletal growth (3). In healthy young adults, bone formation and bone resorption are balanced, resulting in no net increase or decrease in skeletal mass. With advancing age, men and women experience an imbalance in bone remodeling in which resorption is slightly greater than formation, resulting in a continuous net loss of bone mass with time (1,2,4,12). If this imbalance persists, bone mass may decline until the skeleton is insufficient to withstand normal mechanical stresses, and it becomes abnormally susceptible to fractures. The excessive loss of bone mass with an increased susceptibility to fractures is a disorder known as osteoporosis (5).

The most common form of osteoporosis occurs in postmenopausal women and is the result of estrogen deficiency (2,12,13). Rapid bone loss accompanies the decline of estrogen levels at the onset of menopause or as a result of surgical removal of the ovaries. Rapid bone loss occurs as a result of the combined effects of an imbalance in bone remodeling and an increase in bone turnover (5,14-16). In the United States, osteoporosis affects some 25 million postmenopausal women and is the cause of approximately 1.5 million fractures annually, including approximately 500,000 vertebral crush fractures, 250,000 hip fractures, and 200,000 distal radius fractures (2,5,17).

Hormone replacement therapy is currently the most widely prescribed therapy for the prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women (4,5,18-20). However many women cannot, or will not, avail themselves of hormone replacement therapy because of the potential for the increased risk of cancer and the resumption of menstrual bleeding. For this reason, other compounds such as bisphosphonates, a standard treatment for Paget's disease of bone, have been developed to treat osteoporosis. The anti-resorptive properties of bisphosphonates decrease bone remodeling and, consequently, decrease the overall loss of bone.

Biochemical markers are useful in monitoring metabolic bone disease. Urinary hydroxyproline and total serum alkaline phosphatase have been used for monitoring the treatment of Paget's disease. Osteoporosis, however, represents a more subtle modification of the bone remodeling process; therefore, more specific and sensitive markers are needed.

The Ostase BAP assay is an *in vitro* device for the quantitative measurement of bone-specific alkaline phosphatase (BAP) in human serum. Changes in BAP have been shown to be useful in patients undergoing therapy for metabolic bone disorders (6,7,10,21,22).

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The Ostase BAP assay is a solid phase, monoclonal antibody immunoenzymetric assay. Samples containing BAP are reacted with a solution containing a biotin-labeled, BAP-specific monoclonal antibody. The reaction takes place in plastic well strips (solid phase) coated with streptavidin and enclosed in a plastic frame. Following the formation of a solid phase/capture antibody/BAP complex, the microplate is washed to remove unbound BAP and is then incubated with an enzyme substrate. The amount of substrate turnover is determined colorimetrically by measuring the absorbance of the quenched reaction at 405 nm in a microplate reader. The absorbance is proportional to the concentration of BAP present in the test sample. The calculation of BAP concentration in the sample is based on concurrent testing of BAP calibrators and Zero Calibrator/Diluent.

PRODUCT INFORMATION

Components	Cat. AC-20F1 96 Tests
Conjugate [CONJ] Anti-BAP (mouse monoclonal IgG) with biotin in a bovine/horse protein matrix with 0.09% sodium azide.	1 x 14 mL
Microplates [MICROPLAT] Streptavidin coated plastic well strips in a plastic tray. Desiccant: silica gel.	1 x 96 wells
Zero Calibrator/Diluent (0) [CAL 0] A bovine protein matrix containing no detectable concentration of BAP (0 µg BAP/L) and 0.09% sodium azide.	1 x 14 mL
Calibrators (1-5) [CAL 1] - [5] A bovine protein matrix containing approximately 7, 15, 30, 60, and 90 µg human BAP/L and 0.09% sodium azide.	5 x 1 mL
Low Control (1) [CTRL 1] A bovine protein matrix containing approximately 11 µg human BAP/L and 0.09% sodium azide. Refer to Quality Control Report for assigned range.	1 x 1 mL
High Control (2) [CTRL 2] A bovine protein matrix containing approximately 45 µg human BAP/L and 0.09% sodium azide. Refer to Quality Control Report for assigned range.	1 x 1 mL
Wash Concentrate [WASHBUF 20X] Phosphate buffered saline containing Tween.	1 x 50 mL
Substrate [SUBS pNPP] p-nitrophenyl phosphate in a stabilizing buffer containing preservatives.	1 x 20 mL
Quench Reagent [NaOH] 1 N sodium hydroxide.	1 x 14 mL
Quality Control Report, Package Insert	1 each

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. **For *in vitro* diagnostic use only.**
2. **Do not pipette by mouth.**
3. **Do not eat, drink or smoke in designated work areas.**
4. **Wash hands thoroughly after handling specimens and kit reagents.**
5. Some components in this kit contain material of human origin which has been tested using FDA-approved methods and has been found negative for antibody to human immunodeficiency virus (HIV-1 and HIV-2), antibody to Hepatitis C virus and for Hepatitis B surface antigen (HBsAg). No known test method can offer total assurance that HIV-1, HIV-2, Hepatitis B virus, Hepatitis C virus or other infectious agents are absent. **Handle these reagents as if they were potentially infectious** (23).
6. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up (24).
7. The Quench Reagent for this kit contains 1 N NaOH, a corrosive which causes burns. Avoid contact with skin and eyes. Do not ingest or inhale. Safety glasses, gloves and lab coat should be worn when working in the laboratory.
8. **Avoid microbial contamination of the reagents when dispensing aliquots.**

STORAGE AND STABILITY

- Ostase BAP assay reagents are to be stored between 2 and 8°C, at which temperatures they are stable until the expiration date printed on the box label.
- Wash and Quench reagents are stable at 2–30°C until the expiration dates printed on the bottle labels.
- All reagents must be brought to room temperature (18–25°C) prior to use. After use all reagents except the Wash solution should be stored at 2–8°C.
- Recovery of the kit control concentrations should fall within the stated ranges.
- Unused well strips should be returned to the plastic storage tray with the desiccant pouch provided and kept at 2–8°C.
- Do not use kit components beyond the expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- No special preparation of the patient is necessary.
- A whole blood specimen should be obtained by acceptable medical technique.
- Allow the blood to clot and separate the serum by centrifugation.
- Specimens should be collected in such a way as to avoid hemolysis.
- Serum is required for the Ostase BAP assay. Performance with plasma samples has not been established.
- If the serum sample is to be assayed in 24 to 48 hours after collection, the specimen should be stored in a refrigerator at 2–8°C.
- Specimens held for longer times (up to 2 months) should be frozen at –70°C.
- Turbid serum samples or samples containing particulate matter should be centrifuged prior to assay.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Disposable tip precision pipettors: fixed volume or adjustable for 50, 100, and 150 µL (± 1%). Optionally, a multichannel precision pipette can be used together with disposable V-shaped troughs for addition of anti-BAP assay conjugate, Substrate and Quench reagents.
- Disposable pipette tips for 50, 100, 150 µL
- Test tubes for sample dilutions
- Microplate washer
- Aspiration device
- Distilled water
- Timer
- Container for storage of Wash solution
- Microplate reader (405 nm primary wavelength, 600–650 nm background subtraction) and data reduction software
- Horizontal microplate rotator (500 rpm to 900 rpm range)

For information on a complete reagent handling system, data reduction system, and liquid handling devices, contact your local sales representative.

PREPARATION OF REAGENTS

- Bring all reagents to room temperature (18–25°C) prior to use.
- Thoroughly mix reagents before each use by gentle agitation or swirling.
- Use a clean pipette tip for each specimen, calibrator or control to avoid contamination.
- Wash solution: To prepare Wash solution, add Wash Concentrate to 950 mL of distilled water and mix.

PROCEDURE

- The procedure for the Ostase BAP assay is performed at room temperature. Bring all serum specimens and kit components to room temperature (18–25°C) and mix well before use.
- The Zero Calibrator/Diluent, calibrators and controls should be tested in duplicate in the same plate holder.
- Because the termination of each incubation stops a reaction that is in progress (i.e., antibody binding or substrate turnover), reliable calibration of the assay depends on ensuring that the incubation times are essentially the same for all of the wells.

The assay procedure is as follows:

1. Label test well strips/holders appropriately and load strips into holder frame. Run in duplicate each of 6 calibrators, low and high controls for each assay.
2. Pipette 50 µL of Zero Calibrator/calibrators B-F/controls/patient specimens into the bottom of each assigned well.
3. Pipette 100 µL of conjugate into each well.
4. Incubate for 1 hour at 18–25°C using a horizontal rotator set at 500 rpm to 900 rpm.
5. Wash the microplate wells 3 times by:
 - a) Aspirating the liquid from the first strip.
 - b) Pipetting 300 µL of Wash solution into the first strip.
 - c) Repeating steps a and b on all subsequent strips.
 - d) Repeating steps a and c twice.
6. Dispense 150 µL of Substrate reagent into each well. Proceed to next step without delay.
7. Incubate for 13–15 minutes at 18–25°C using a horizontal rotator set at 500 rpm to 900 rpm. Proceed to next step without delay.
8. Dispense 100 µL of Quench Reagent into each well.
9. Read the absorbance of each well at 405 nm in a microplate reader, subtracting a blank reading at 600–650 nm for each well. Read the plate within 1 hour of quenching the reaction.
10. Calculate the results as described in "Instrumentation and Calculation of Results."

PROCEDURAL COMMENTS

1. **Note on plate washing:** Immunoenzymetric assays require efficient washing to remove the unbound, biotin-labeled antibody. Therefore, it is very important to wash each well efficiently, removing the last droplets of Wash solution to achieve optimal results.
2. If a specimen was found to contain BAP at a concentration greater than the highest calibrator, the specimen should be diluted with the Zero Calibrator/Diluent and assayed according to the assay Procedure. The dilution factor must be incorporated in the calculation of results. Each diluted specimen should be mixed thoroughly prior to testing. The recommended dilutions for specimens containing BAP greater than the highest calibrator are 1:3, 1:5, or 1:10. However, it is desirable to dilute serum specimens with BAP greater than the highest calibrator so that the diluted sample reads greater than 10 µg BAP/L.
3. Because absorbance is a function of temperature and duration of the Substrate reagent incubation, it is very important that this incubation be the same for all wells/plates. This can be accomplished by ensuring that the elapsed time for pipetting reagents from beginning to end – without interruption – is exactly the same for both the Substrate reagent addition step and the Quench Reagent addition step. To ensure best results, the addition of these reagents should not exceed 90 seconds and total substrate incubation should not exceed 15 minutes.
4. For convenience, repeating or multichannel pipettors may be used for dispensing assay conjugate, Wash solution, Substrate and Quench reagents. Pipettors with disposable tips are recommended for pipetting calibrators, controls and specimens. The pipette tips should be changed after each sample is pipetted to avoid potential sample carryover and contamination of the reagents or specimens.
5. Do not mix materials from different kit lots.

INSTRUMENTATION AND CALCULATION OF RESULTS

Results may be calculated by using computer-assisted methods or manually on linear graph paper.

Computer-Assisted Method

A point-to-point curve fit is recommended. Point-to-point software that connects a straight line between the means of calibrator replicates – including the 0 µg BAP/L calibrator – provides good results with the procedure and calibration method described. For additional information on computer-assisted data reduction, consult your local sales representative.

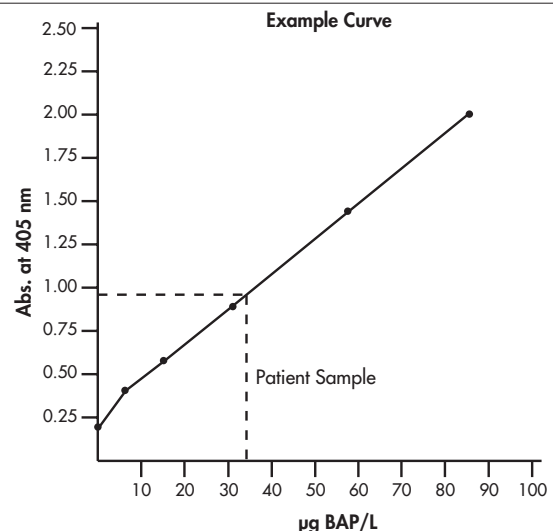
Manual Method

The Ostase BAP calibration curve may be constructed manually on linear graph paper by plotting the average absorbance for each calibrator on the y-axis versus the concentration of BAP in the Calibrator on the x-axis. A point-to-point curve should be drawn through the calibration points. Do not force the curve to a straight line.

To determine the concentration of BAP in the controls and patient specimens, extend a horizontal line from the absorbance value for the test sample to the calibration curve. At the point of intersection of the horizontal line and the curve, drop a vertical line to the x-axis and read the concentration of BAP.

If the absorbance for any replicate of the sample is greater than the absorbance of the highest Calibrator the specimen must be diluted and re-assayed. The observed concentration of the diluted sample must be multiplied by the dilution factor.

Example Data				
Well #	Description	Abs. 405 nm	Mean Abs.	BAP µg/L
1	Calibrator (0)	0.193		
2		0.187	0.190	0.0
3	Calibrator (1)	0.401		
4		0.402	0.402	7.2
5	Calibrator (2)	0.595		
6		0.572	0.584	15.5
7	Calibrator (3)	0.908		
8		0.866	0.887	31.9
9	Calibrator (4)	1.499		
10		1.460	1.479	58.4
11	Calibrator (5)	2.000		
12		2.051	2.026	85.8
13	Patient Sample	0.911		33.0



QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS

Good laboratory practices include the use of control specimens within an assay run to ensure that all reagents and protocols are performing properly. The Ostase BAP antibody set contains controls which can be used to verify assay performance.

1. Recovery of the control concentrations should fall within the stated ranges.
2. The coefficient of variation (%CV) of the 405 nm absorbance readings for each calibrator and control sample should be less than 10%.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

HAMA Interference: Some individuals have antibodies to mouse protein (HAMA), which can cause interference in immunoassays that employ antibodies derived from mice. In particular, it has been reported that serum samples from patients who have undergone therapy or diagnostic procedures that include infusion of mouse monoclonal antibody may produce erroneous results in such assays. Therefore, Ostase BAP results for such patients should be used only in conjunction with results from some other diagnostic procedure and with information available from the clinical evaluation of the patient.

The immunoreactivity of liver ALP has been determined in the Ostase BAP assay: 100 U/L of liver ALP activity gives a result of 2.8 to 6.2 µg/L in the Ostase BAP assay. Serum samples with significant elevations of liver ALP activity may yield elevated results in the Ostase BAP assay. Patients with metabolic bone disorders who have low levels of disease activity may have bone-specific ALP levels that fall within the Ostase BAP assay expected values.

Ostase BAP results should be used only in conjunction with information available from the clinical evaluation of the patient and other diagnostic procedures. Therefore, the Ostase BAP assay is not recommended for use as a screening procedure to detect the presence of osteoporosis in the general population. Furthermore, the Ostase BAP assay cannot be used to assess the rate of bone formation or bone remodeling.

EXPECTED VALUES

The BAP results in the Expected Values and Clinical Studies sections were generated with the Tandem-R Ostase assay. However, a correlation study of the Ostase BAP and Tandem-R Ostase assays demonstrated good agreement between the assays ($y = 1.02x + 0.28$, $r = 0.9700$, $n = 136$).

The Tandem-R Ostase assay was evaluated in studies involving apparently healthy adults (20 to 89 years of age) at 6 test sites. The mean BAP concentration, standard deviation (SD), median, and 95th percentiles for males (N = 217), premenopausal females (N = 228), and postmenopausal females (N = 529) are presented in the following table.

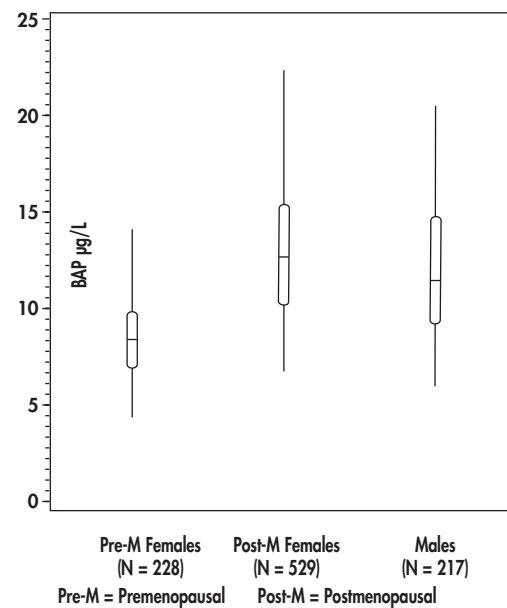
Summary of BAP Concentrations in Apparently Healthy Adults*

	N	BAP Mean µg/L	SD	BAP Median µg/L	BAP 95th Percentile µg/L
Males	217	12.3	4.3	11.6	20.1
Pre-menopausal Females	228	8.7	2.9	8.5	14.3
Post-menopausal Females	529	13.2	4.7	12.5	22.4

* Results generated with the Tandem-R Ostase Immunoradiometric Assay

The results presented above show that mean BAP concentrations in a population of postmenopausal women are elevated over mean BAP concentrations in premenopausal women ($p \leq 0.0001$). This increase in mean BAP reflects the increase in bone remodeling associated with estrogen deficiency in a postmenopausal population compared to a premenopausal population (2,8,12,13). However, there is considerable overlap in BAP concentrations in the populations shown in the distribution below.

Distribution of BAP Concentrations in Apparently Healthy Adults*



* Results generated with the Tandem-R Ostase Immunoradiometric assay.

For each of the populations shown in the plot: 1) The horizontal lines in each box represent median concentrations. 2) The upper and lower margins of each box represent interquartile ranges – i.e., the upper margin delimits 25% of the values above the median while the lower margin delimits 25% of the values below the median. 3) The tip of each lower whisker represents the 5th percentile concentration, while the tip of each upper whisker represents the 95th percentile concentration.

The ranges of observations reported above are representative of this study only, and do not necessarily reflect the ranges that will be observed in a particular clinical laboratory. Each laboratory should establish its own reference interval.

CLINICAL STUDIES

Paget's Disease

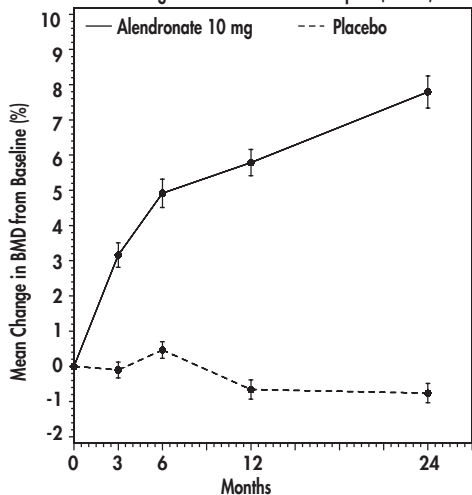
Correlation studies were performed to compare serum BAP concentrations obtained using the Tandem-R Ostase assay to those results obtained using two currently marketed electrophoretic methods and two enzyme activity assays for total alkaline phosphatase (TAP). These studies were conducted at clinical investigation sites using 100 samples from patients with Paget's disease. The correlation coefficient (r) obtained between the Tandem-R Ostase assay and the electrophoretic methods is 0.9418. The correlation coefficient (r) obtained for the correlation between Tandem-R Ostase and the total alkaline phosphatase enzyme activity assays is 0.9459.

Postmenopausal Osteoporosis – Bisphosphonate Treatment

In order to demonstrate the ability of the Tandem-R Ostase assay to reflect alterations in bone remodeling in response to therapy in postmenopausal osteoporosis, a study was conducted in patients with clinically-defined osteoporosis who were treated with a bisphosphonate (alendronate sodium). This study was a multi-site, prospective, double-blind, placebo-controlled study (25). Data are available for subjects who were randomized to placebo (N = 148) or to alendronate 10 mg (N = 74). All subjects took 500 mg of supplemental calcium daily. Bone mineral density (BMD) measurements were made at the lumbar spine using dual-energy x-ray absorptiometry. Serial BAP determinations were made using the Tandem Ostase assay.

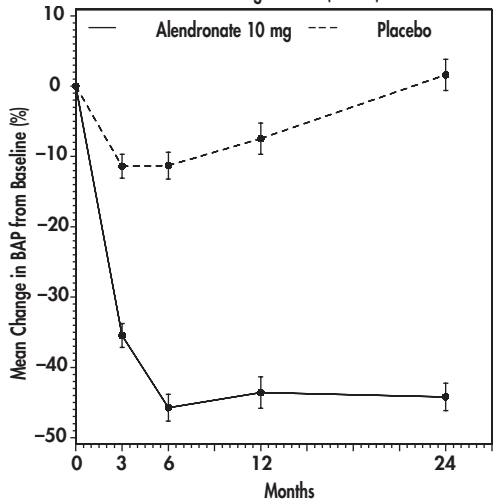
Mean percent changes from baseline and standard error bars for BMD in the placebo and treated groups are plotted at each timepoint in the figure below. A 7.8% increase in BMD over baseline is observed in the alendronate group at 24 months, indicating that the bisphosphonate therapy resulted in a positive effect on bone. As expected, a 0.8% decrease in BMD is observed in the calcium-supplemented placebo group at 24 months.

Alendronate 10 mg and Placebo Group Data
Mean Percent Change in BMD at the Lumbar Spine (± 1 SE) vs. Time



A summary of two-year data consisting of serial BAP concentrations as measured by the Tandem Ostase assay for the placebo and the alendronate 10 mg groups is presented below. Mean percent decreases from baseline and standard error bars for BAP for the placebo (baseline BAP = 17.7 $\mu\text{g/L} \pm 6.0$) and alendronate-treated (baseline BAP = 17.0 $\mu\text{g/L} \pm 4.6$) groups are plotted at each timepoint. The data show a time-dependent decrease in BAP concentrations for the alendronate-treated group, reaching a nadir at 6 months. As expected a small, transient change in marker levels is observed in the calcium-supplemented placebo group (26,27). The decrease and subsequent stabilization of the BAP changes in the alendronate-treated group suggest that a new steady state in bone remodeling occurred as a result of the bisphosphonate treatment (24,28,29).

Alendronate 10 mg and Placebo Group Data
Mean Percent Change in BAP (± 1 SE) vs. Time



The observed decreases in BAP concentrations for the alendronate-treated group, as measured by the Tandem Ostase assay, are significantly different from baseline ($p \leq 0.0001$) as early as 3 months and at all subsequent timepoints (6, 12, and 24 months). In contrast, BAP concentrations decreased by 11% at 3 and 6 months in the placebo group and returned to baseline by 24 months.

The BAP changes and BMD changes in this study are consistent with current knowledge of bone remodeling and the mechanism of action of anti-osteoporotic therapies (24). From these results, it may be concluded that the decrease in BAP concentrations as measured by the Tandem Ostase assay in alendronate-treated subjects reflects changes in bone remodeling that result from anti-osteoporotic therapy.

The percent change between two serum marker values must exceed both the biological (within-subject) variation of the marker and the analytical variation of the assay in order to have clinical significance (30). This threshold is referred to as the minimum percent change. Percent changes in a marker that exceed the minimum percent change may be attributed to a change in the clinical status of the subject, such as response to therapy (30). The minimum percent change for a biochemical marker has been described by Soletermos (30) and others (31) with the formula

$$\text{Minimum Percent Change} = \sqrt{2 \times Z \times \sqrt{CV_p^2 + CV_a^2}}$$

in which CV_p is within-subject variability, CV_a is assay imprecision, and Z is the Z-statistic, which depends on the probability selected for significance and on whether the change expected is unidirectional ($Z = 1.645$) or bidirectional ($Z = 1.96$).

The within-subject variability of the Tandem Ostase assay was determined from serum samples from 17 healthy postmenopausal women collected every day over a five-day period. The average biological coefficient of variation was calculated as 4.2%.

Analytical variation was based on between-run precision data found in the SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS section of this insert.

The minimum percent change for BAP as measured by the Tandem Ostase assay was calculated as 25%. Therefore, changes in BAP concentrations in postmenopausal women that exceed 25% may be attributed to changes in bone remodeling.

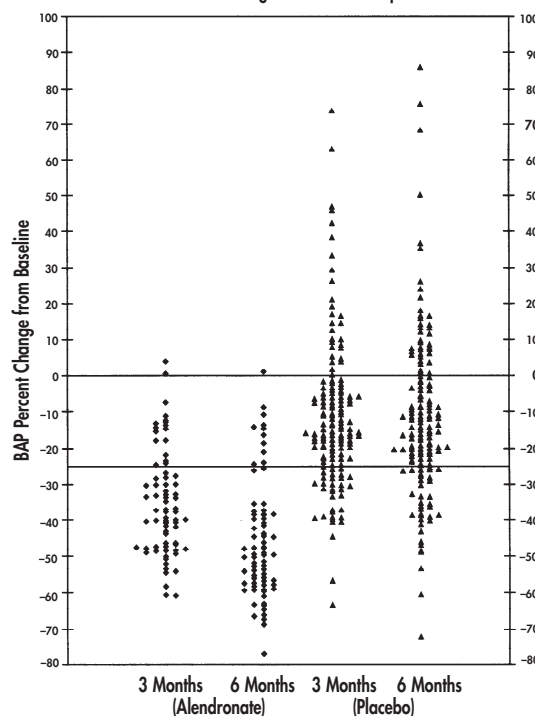
Percent changes of BAP relative to baseline for individual subjects are presented below. Data are presented for both the placebo and the alendronate 10 mg subjects at the 3-month and 6-month timepoints. The horizontal line at zero represents baseline, and the horizontal line at -25% represents the minimum percent change for BAP as measured by the Tandem Ostase assay. For the alendronate 10 mg group, 77.0% (57/74) of the subjects had an BAP decrease from baseline (time 0) of 25% or greater at 3 months, and 85.1% (63/74) of the subjects had an BAP decrease from baseline of 25% or greater at 6 months. By 24 months, 90.3% (65/72) had a decrease in BAP of 25% or more. For the calcium-supplemented placebo group, 75.7% (112/148) of the subjects had an BAP decrease from baseline (time 0) that was less than 25% (at 6 months). By 24 months, 88.1% (126/143) of the placebo group had BAP decreases of less than 25%. These data are further summarized in the table provided below. This table shows the number of treated and placebo subjects (and the percent of subjects) who had BAP decreases from baseline < 25% or > 25% (at 3 and 6 months, respectively).

Summary of Individual BAP Percent Changes from Baseline
for Alendronate 10 mg and Placebo Subjects
Number of Subjects/Total Number of Subjects

BAP Percent Change Cutoff	3 Months		6 Months	
	Placebo N = 148	Alendronate 10 mg N = 74	Placebo N = 148	Alendronate 10 mg N = 74
25% or Greater Decrease	33/148 (22.3%)	57/74 (77.0%)	36/148 (24.3%)	63/74 (85.1%)
Less than 25% Decrease	115/148 (77.7%)	17/74 (23.0%)	112/148 (75.7%)	11/74 (14.9%)

In the alendronate 10 mg group, a mean BAP decrease of 45.7% from baseline to 6 months was followed by a mean increase in BMD of 7.8% at 24 months. Conversely, the small change from baseline for BAP at 6 months for the calcium-supplemented placebo group (-11.3%) was accompanied by a small decrease in BMD of -0.8% at 24 months.

BAP Percent Changes from Baseline
Alendronate 10 mg and Placebo Subjects



In summary, it has been demonstrated that:

1. BAP concentrations reflect the increase in bone remodeling associated with estrogen deficiency in apparently healthy postmenopausal females.
2. BAP concentrations reflect changes in bone remodeling that occur as a result of anti-osteoporotic therapy with alendronate in postmenopausal women.
3. Clinically significant decreases in BAP concentrations at 3 and 6 months are indicators of changes in bone remodeling. Effective therapy with alendronate 10 mg in postmenopausal osteoporotic women is indicated by increases in BMD at 24 months.
4. A decrease in BAP of 25% or more from baseline, as measured by the Tandem Ostase assay, may indicate changes in bone remodeling resulting from anti-osteoporotic therapy.

Subjects undergoing anti-osteoporotic therapy with alendronate whose BAP levels do not decrease by 25% from baseline at early timepoints should be re-tested at later timepoints. Of the 11 subjects who demonstrated less than 25% decrease in BAP from baseline at 6 months, 9 of them eventually demonstrated greater than 25% decrease in BAP from baseline by 24 months. All of these subjects responded to alendronate 10 mg as determined by increases in BMD. Treated subjects whose BAP levels do not decrease by 25% from baseline should be evaluated by other clinical means to determine treatment efficacy.

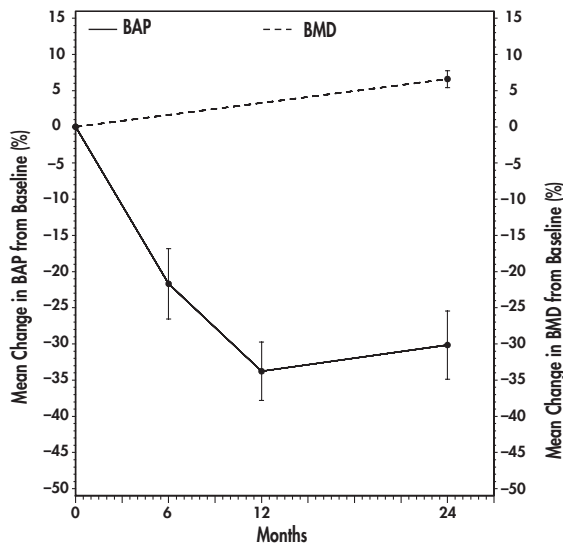
Postmenopausal Women – Hormone Replacement Therapy (HRT)

In addition to the bisphosphonate study described above, other studies were initiated in order to demonstrate the ability of the Tandem Ostase assay to reflect alterations in bone remodeling in response to estrogen therapy (29,32). Data are presented below from one of the studies. In this study, healthy non-hysterectomized postmenopausal women (n = 12), aged 65-75 years, received daily estrogen/progestin therapy (Premarin 0.625 mg and Provera 2.5 mg) for two years. In addition, 6 healthy hysterectomized women received estrogen alone for a total study population of 18.

Skeletal ALP was measured by the Tandem Ostase assay at baseline and at 6, 12, and 24 months. BMD at the lumbar spine was evaluated at baseline and at 24 months.

Mean percent changes from baseline and standard error bars for BAP (left y-axis) and for BMD (right y-axis) are plotted at each timepoint in the figure below. A 6.6% increase in BMD at the lumbar spine over baseline is observed for the estrogen-treated subjects, indicating that the estrogen therapy resulted in a positive effect on bone. The data presented in the figure below also show a time-dependent decrease in BAP concentrations for the treated group, reaching a nadir at 12 months. The observed decreases in BAP concentrations for the estrogen treated group, as measured by the Tandem Ostase assay, are significantly different from baseline ($p \leq 0.0001$) at 6 months and at all subsequent timepoints (12 and 24 months).

Estrogen-Treated Group Data
Mean Percent Change from Baseline (\pm 1 SE) in BAP and L-Spine BMD vs. Time



The BAP and BMD changes in this study are consistent with current knowledge of bone remodeling and the mechanism of action of anti-osteoporotic therapies (5,33). From these results, it may be concluded that the decrease in BAP concentrations as measured by the Tandem Ostase assay in estrogen-treated subjects reflects changes in bone turnover that result from anti-osteoporotic therapy.

Tandem Ostase results should be used only in conjunction with information available from the clinical evaluation of the patient and other diagnostic procedures.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Within-Run Precision

Within-run precision was determined by assaying four serum pools containing various concentrations of BAP. Each serum pool was assayed in replicates of 20. The data are presented below.

Serum Pool	1	2	3	4
Number of Replicates	20	20	20	20
Mean $\mu\text{g/L}$	7.4	27.3	52.7	79.5
Standard Deviation	0.48	0.78	1.35	3.54
% CV	6.5	2.9	2.6	4.5

Between-Run Precision

Between-run precision was determined by duplicate measurements of four serum pools over a series of 20 individually calibrated runs:

Serum Pool	A	B	C	D
Number of Assays	20	20	20	20
Mean $\mu\text{g/L}$	8.4	29.2	55.6	81.1
Standard Deviation	0.47	1.88	2.03	4.92
% CV	5.8	6.4	3.7	6.1

Recovery and Dilution

Various quantities of a serum sample containing elevated levels of BAP were added to human sera containing endogenous BAP and the samples were assayed in triplicate.

Spike $\mu\text{g/L}$	Expected Concentration $\mu\text{g/L}$	Observed Concentration $\mu\text{g/L}$	% Recovery*
14.0	24.6	24.8	100.9
39.9	50.5	48.8	96.6
59.2	69.8	66.0	94.6
92.2	102.8	92.6	90.1

*% recovery equals the observed concentration divided by the expected concentration times 100.

A serum sample containing an elevated BAP concentration was diluted with the Zero Calibrator/Diluent and assayed at multiple dilutions.

Dilution	Expected Concentration $\mu\text{g/L}$	Observed Concentration $\mu\text{g/L}$	% Recovery*
Neat	N/A	54.6	N/A
1:4	27.3	27.9	102.3
1:6	18.2	17.4	95.4
1:8	13.7	12.7	92.8

*% recovery equals the observed concentration divided by the expected concentration times 100.

Interfering Substances

- **Hemoglobin**, which was tested at concentrations up to 500 mg/dL, does not interfere with the Ostase BAP assay.
- **Unconjugated and conjugated bilirubin**, which were tested at concentrations up to 40 mg/dL and 20 mg/dL, respectively, do not interfere with the Ostase BAP assay.
- **Triglycerides**, which were tested at concentrations up to 2000 mg/dL, do not interfere with the Ostase BAP assay.
- **Total protein**, which was tested at concentrations between 3 and 14 g/dL, does not interfere with the Ostase BAP assay.
- 100 U/L Intestinal ALP produced a result of 1.0 $\mu\text{g/L}$ in the Ostase BAP assay.
- 100 U/L Placental ALP did not produce a detectable result in the Ostase BAP assay.

Liver ALP Reactivity

The liver ALP reactivity in the Ostase BAP assay was determined using serum samples from liver disease patients and serum samples from patients with Paget's disease. Samples were screened by electrophoresis and shown to contain > 95% liver ALP or BAP.

Two methods were used to evaluate liver ALP reactivity. The first procedure, described by Moss and Whitby (35), used a heat inactivation method that minimizes the contribution of endogenous BAP in the samples with elevated liver ALP. Using this method, 100 U/L liver ALP activity produced a result of 2.8 to 3.4 $\mu\text{g/L}$ in the Ostase BAP assay.

The second procedure, described by Price, et al. (36), used the slope method (Ostase BAP assay vs. total ALP), where no pretreatment of the samples occurred. In this study, Ostase BAP quantitation of the liver ALP and BAP samples (y-axis) was plotted against the total ALP activity (x-axis) in each sample. From the slope values of the liver ALP and BAP samples, it was determined that:

- 100 U/L of liver ALP activity produced a result of 6.2 $\mu\text{g/L}$ in the Ostase BAP assay; and
- 100 U/L of BAP activity produced a result of 36.9 $\mu\text{g/L}$ in the Ostase BAP assay.

Interference by Drugs

Various concentrations of drugs were added to three separate serum pools containing BAP and assayed in quadruplicate. The drugs and highest concentrations tested are listed below. The testing was based on NCCLS Guideline EP-7P (Interference Testing in Clinical Testing).

acetaminophen	20 mg/dL
alendronate	5 mg/dL
aspirin	50 mg/dL
calcitonin-salmon	112 IU/dL
calcium	20 mg/dL
estrogen	400 ng/dL
etidronate	105 mg/dL
ibuprofen	40 mg/dL
pamidronate	18 mg/dL
progesterone	25 mg/dL
vitamin D	80,500 IU/dL

These drugs did not interfere with the recovery of BAP from the serum pools in the Ostase BAP assay.

Minimum Detectable Concentration

The minimum detectable concentration of BAP in the Ostase BAP assay is estimated to be 0.7 µg BAP/L. The minimum detectable concentration is defined as the concentration of BAP that corresponds to the absorbance that is two standard deviations greater than the mean absorbance of 20 replicate determinations of the Zero Calibrator/Diluent.

Purchase of this kit licenses its use under U.S. Patent Nos. 4,376,110 and 4,486,530.

Tandem® and Ostase® are registered trademarks of Hybritech Incorporated, a subsidiary of Beckman Coulter, Inc.

*Tween is a Trademark of ICI Americas, Inc.

Ostase® BAP

Test immunoenzymométrique



Pour le dosage de la Phosphatase Alcaline d'origine Osseuse (BAP) dans le sérum humain

UTILISATION

Le test immunoenzymométrique Ostase BAP est un système *in vitro* indiqué pour le dosage de la phosphatase alcaline osseuse (BAP), indicateur de l'activité ostéoblastique, dans le sérum humain. Ce système a pour but d'être utilisé comme une aide dans la prise en charge de l'ostéoporose postménopausique et la maladie de Paget.

GENERALITES

L'os est un tissu dynamique dans lequel la formation et la résorption osseuses se poursuivent tout au long de la vie selon un processus appelé remodelage ou remaniement osseux. Le processus de remodelage est fonction d'interactions complexes entre deux types de cellules osseuses : les ostéoblastes responsables de la formation osseuse et les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse (1-3). La formation et la résorption osseuses sont des processus interdépendants qui, dans des circonstances normales, sont étroitement associés (2,4). Cette relation d'association est indispensable au maintien de la compétence biochimique du squelette, préservant ainsi l'organisation de la structure, de la forme et de la force des os (2,3,5).

Il est admis que les concentrations sériques de BAP reflètent le statut métabolique des ostéoblastes (6,7). Une estimation précise du métabolisme osseux est essentielle pour la détermination de la gravité de l'affection du métabolisme osseux et des réponses à la thérapie. Le dosage des concentrations sériques de la BAP s'est révélé utile dans l'évaluation de patients atteints de la maladie de Paget, d'ostéomalacie, d'hyperparathyroïdisme primitif, d'ostéodystrophie d'origine rénale, d'ostéoporose et de métastases osseuses (6-10). Le dosage de la phosphatase alcaline totale a été la méthode admise pour le diagnostic et la prise en charge de patients atteints de la maladie de Paget.

La maladie de Paget des os est une affection commune du squelette dans laquelle il y a prolifération focalisée des constituants cellulaires normaux de l'os. La maladie de Paget est plus répandue que l'on ne pensait avec, dans certaines populations, un taux d'incidence de 3 à 4% chez les patients d'âge moyen et de 10 à 15% chez les personnes âgées (11). Cette maladie ne touche pas les individus jeunes. La majorité des patients atteints de la maladie de Paget est asymptomatique et souvent n'est pas diagnostiquée à moins qu'une radiographie anormale ou une concentration sérique anormale de phosphatase alcaline ne soit mise en évidence durant une évaluation médicale effectuée pour des raisons sans aucune relation. Les symptômes les plus courants dont se plaignent les patients sont la douleur et des déformations.

Le risque d'ostéoporose, une autre affection du remodelage osseux, dépend en partie du développement du squelette, de l'obtention de la masse osseuse maximale et, plus tard dans la vie, de la quantité osseuse perdue. Chez les enfants en bonne santé, la formation osseuse est favorisée par rapport à la résorption osseuse, ce qui entraîne le développement des os et une croissance normale du squelette (3). Chez les jeunes adultes en bonne santé, la formation et la résorption osseuses sont en équilibre, de sorte qu'il n'y a ni augmentation, ni diminution de la masse osseuse. Avec le vieillissement, les hommes et les femmes sont touchés par un déséquilibre du remodelage osseux dans lequel la résorption osseuse est légèrement supérieure à la formation osseuse, entraînant, avec le temps, une perte continue et nette de la masse osseuse (1,2,4,12). Si ce déséquilibre persiste, la masse osseuse peut décroître jusqu'à ce que le squelette ne puisse plus supporter les contraintes mécaniques normales et devienne anormalement sensible aux fractures. La perte excessive de la masse osseuse accompagnée d'une sensibilité accrue aux fractures est une affection connue sous le nom d'ostéoporose (5).

La forme la plus courante de l'ostéoporose touche les femmes postménopausiques et elle est le résultat d'un déficit en œstrogènes (2,12,13). Une perte osseuse rapide accompagne le déclin des concentrations d'œstrogènes lorsque survient la ménopause ou elle est le résultat d'une ovariectomie radicale. Cette perte osseuse accélérée résulte des effets combinés d'un déséquilibre du remodelage osseux et d'une augmentation de la consommation osseuse (5,14-16). Aux Etats-Unis, l'ostéoporose touche quelques 25 millions de femmes post-ménopausiques et est la cause d'environ 1,5 million de fractures par an, y compris environ 500 000 fractures par tassement des vertèbres, 250 000 fractures du col du fémur et 200 000 fractures du poignet (2,5,17).

L'hormonothérapie substitutive est actuellement le traitement le plus largement prescrit dans la prévention des fractures ostéoporotiques chez les femmes postménopausiques (4,5,18-20). Toutefois de nombreuses femmes ne peuvent pas ou ne souhaitent pas d'hormonothérapie substitutive à cause de la possibilité d'un risque accru de cancer et de la réapparition de saignements menstruels. Pour cette raison, d'autres composés tels que les biphosphonates, traitement standard pour la maladie de Paget des os, ont été développés pour traiter l'ostéoporose. Les propriétés anti-résorption des biphosphonates diminuent le remodelage osseux et, par conséquent, diminuent la perte osseuse globale.

Les marqueurs biochimiques sont utiles dans le contrôle des maladies du métabolisme osseux. L'hydroxyproline urinaire et la phosphatase alcaline totale sérique ont été utilisées pour contrôler le traitement de la maladie de Paget. Toutefois, l'ostéoporose constitue une modification plus subtile du processus de remodelage osseux ; par conséquent, des marqueurs plus spécifiques et plus sensibles sont nécessaires.

Le test Ostase BAP est un système *in vitro* pour le dosage de la phosphatase alcaline osseuse (BAP) dans le sérum humain. La mesure des modifications de la concentration en BAP s'est avérée utile chez les patients traités pour différentes pathologies du métabolisme osseux (6,7,10,21,22).

PRINCIPES DU TEST

Le test Ostase BAP est un test immunoenzymométrique à deux sites sur phase solide utilisant des anticorps monoclonaux. Les échantillons contenant de la BAP sont mis en contact avec une solution contenant un anticorps monoclonal spécifique de la BAP et marqué à la biotine. La réaction a lieu dans des barrettes de puits en plastique (phase solide) sensibilisées avec de la streptavidine et entourées d'un cadre en plastique. Après la formation d'un complexe phase solide/anticorps de capture/BAP, la microplaque est lavée pour éliminer la BAP non liée et elle est ensuite incubée avec un substrat enzymatique. La quantité de substrat consommé est déterminée par colorimétrie en mesurant l'absorption de la réaction après blocage à 405 nm dans un lecteur de microplaques. L'absorption est proportionnelle à la concentration de BAP présente

dans l'échantillon à tester. Le calcul de la concentration en BAP présente dans l'échantillon est basé sur le dosage simultané des étalons BAP et de l'Etalon zéro/Diluant.

DESCRIPTION DU PRODUIT

Composants	Code AC-20F1 96 dosages
Conjugué [CONJ] Anti-BAP (IgG monoclonal de souris) à la biotine dans une matrice protéique bovine-cheval contenant 0,09 % d'azoture de sodium.	1 x 14 mL
Microplaques [MICROPLAT] En plastique constituées de barrettes de micropuits revêtus de streptavidine. Agent dessiccatif : gel de silice.	1 x 96 puits
Etalon zéro/Diluant (0) [CAL 0] Matrice protéique bovine sans BAP détectable (0 µg de BAP/L) et contenant 0,09 % d'azoture de sodium.	1 x 14 mL
Etalons (1-5) [CAL 1] - [5] Matrice protéique bovine contenant approximativement 7, 15, 30, 60 et 90 µg BAP humaine/L et 0,09 % d'azoture de sodium. Se référer à la carte d'étalonnage pour les concentrations attribuées.	5 x 1 mL
Contrôle bas (1) [CTRL 1] Matrice protéique bovine contenant environ 11 µg BAP humaine/L et 0,09% d'azoture de sodium. Consulter la rapport du contrôle de qualité pour la concentration attribuée.	1 x 1 mL
Contrôle haut (2) [CTRL 2] Matrice protéique bovine contenant environ 45 µg BAP humaine/L et 0,09% d'azoture de sodium. Consulter la rapport du contrôle de qualité pour la concentration attribuée.	1 x 1 mL
Solution de lavage concentrée [WASHBUF 20X] Solution salée tamponnée au phosphate contenant du Tween.	1 x 50 mL
Substrat [SUBS] pNPP p-Nitrophényl-phosphate stabilisé dans un tampon contenant des conservateurs.	1 x 20 mL
Réactif de blocage [NaOH] Hydroxyde de sodium 1N.	1 x 14 mL
Rapport du contrôle de qualité, Notice	1 de chaque

PRECAUTIONS D'UTILISATION

1. **Utilisation comme test de diagnostic *in vitro* uniquement.**
2. **Ne pas pipeter avec la bouche.**
3. **Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées.**
4. **Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs de la trousse.**
5. Certains composants de cette trousse contiennent des produits d'origine humaine qui ont été testés et trouvés non-réactifs en anticorps dirigés contre les virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH-1 et VIH-2), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C et en antigène de surface de l'hépatite B (Ag HBs). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence des virus VIH-1, VIH-2, du virus de l'hépatite B et du virus de l'hépatite C ou d'autres agents infectieux, **considérer ces réactifs comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage** (23).
6. L'azoture de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb ou en cuivre pour former des azotures métalliques hautement explosifs. Lors de l'évacuation des liquides, déverser un volume d'eau important afin de prévenir la formation de tels azotures (24).
7. Le réactif de blocage contenu dans cette trousse contient du NaOH 1N, une substance corrosive qui cause des brûlures. Éviter tout contact avec la peau et les yeux. Ne pas ingérer ou inhaler. Il est nécessaire de porter des lunettes de protection, des gants et une blouse lors des manipulations en laboratoire.
8. **Éviter la contamination microbienne des réactifs lors de la distribution d'aliqouts.**

CONSERVATION ET STABILITE

- Les réactifs Ostase BAP doivent être conservés entre 2 et 8°C, températures auxquelles ils sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette de la boîte.
- La solution de lavage et le réactif de blocage sont stables entre 2 et 30°C jusqu'aux dates de péremption imprimées sur les étiquettes des flacons.
- Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (18–25°C) avant utilisation. Après utilisation, tous les réactifs sauf la solution de lavage doivent être conservés entre 2 et 8°C.
- Le pourcentage de récupération des concentrations des contrôles de la trousse doit se situer dans les limites fixées.
- Les barrettes de puits inutilisées doivent être replacées sur le support de conservation en plastique avec le sachet de dessiccant et conservées entre 2 et 8°C.
- Ne pas utiliser des composants de la trousse au-delà de la date de péremption.

RECUEIL ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

- Aucune préparation particulière du patient n'est nécessaire.
- Un prélèvement de sang total doit être réalisé au moyen d'une technique médicale appropriée.
- Laisser le sang coaguler et séparer le sérum par centrifugation.
- Les échantillons doivent être prélevés de façon à éviter une hémolyse.
- Pour le test Ostase BAP, la nature de l'échantillon est le sérum. Les performances avec les échantillons plasmatiques n'ont pas été établies.
- Si l'échantillon de sérum doit être dosé dans les 24-48 heures qui suivent le prélèvement, le conserver dans un réfrigérateur entre 2 et 8°C.
- Les échantillons conservés pendant des périodes plus longues (jusqu'à 2 mois) doivent être congelés à -70°C.
- Les échantillons sériques troubles ou les échantillons contenant des particules doivent être centrifugés avant le dosage.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Pipetteurs de précision à embouts jetables : volume fixe ou réglable pour 50, 100 et 150 µL ($\pm 1\%$). Facultatif : une pipette multi-canaux de précision peut être utilisée avec des gouttières jetables en forme de V pour l'addition du conjugué anti-BAP, du substrat et du réactif de blocage.
- Embouts jetables de pipette pour 50, 100, 150 µL
- Tubes à essai pour les dilutions des échantillons
- Laveuse de microplaques
- Dispositif d'aspiration
- Eau distillée
- Chronomètre
- Récipient pour la conservation de la solution de lavage
- Lecteur de microplaques (principale longueur d'onde 405 nm, soustraction du fond à 600–650 nm) et logiciel de réduction des données
- Rotateur horizontal pour microplaques (plage de 500 à 900 rpm)

Pour obtenir des informations sur un système complet de manipulation des réactifs, le système de réduction des données et les dispositifs de manipulation des réactifs, contacter son représentant local.

PREPARATION DES REACTIFS

- Amener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18 à 25°C) avant utilisation.
- Bien homogénéiser les réactifs avant chaque utilisation par agitation modérée ou par rotation.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque échantillon, étalon et contrôle afin d'éviter toute contamination.
- Solution de lavage : Ajouter la solution de lavage concentrée dans 950 mL d'eau distillée et mélanger.

PROCEDURE

- Le test Ostase BAP est réalisé à température ambiante. Amener tous les échantillons de sérum et les composants de la trousse à température ambiante (18–25°C) et bien mélanger avant utilisation.
- L'Étalon zéro/Diluant, les étalons et les contrôles doivent être testés en double sur le même support de plaque.
- Du fait que l'arrêt de chaque incubation met fin à une réaction en cours (c'est-à-dire liaison d'anticorps ou consommation de substrat), la fiabilité de l'étalonnage du test dépend de l'assurance que les temps d'incubation sont essentiellement les mêmes pour tous les puits.

Le mode opératoire du test est le suivant :

1. Étiqueter correctement les supports/barrettes de puits du test et charger les barrettes sur le cadre support. Tester en double chacun des 6 étalons, le contrôle faible et le contrôle fort pour chaque dosage.
2. Pipeter 50 µL de l'Étalon zéro/des étalons B-F/des contrôles/des échantillons de patients dans le fond de chaque puits attribué.
3. Pipeter 100 µL de conjugué dans chaque puits.
4. Incuber 1 heure à 18–25°C en utilisant un rotateur horizontal réglé entre 500 et 900 rpm.
5. Laver 3 fois les puits de la microplaque en:
 - a. Aspirant le liquide dans la première barrette.
 - b. Pipetant 300 µL de solution de lavage dans la première barrette
 - c. Répétant les étapes a et b sur toutes les barrettes suivantes.
 - d. Répétant 2 fois les étapes a et c.
6. Distribuer 150 µL de réactif substrat dans chaque puits. Passer sans attendre à l'étape suivante.
7. Incuber 13 à 15 minutes à 18–25°C en utilisant un rotateur horizontal réglé entre 500 et 900 rpm. Passer sans attendre à l'étape suivante.
8. Distribuer 100 µL de réactif de blocage dans chaque puits.
9. Lire l'absorption de chaque puits à 405 nm dans un lecteur de microplaques, en soustrayant l'absorption d'un blanc lue à 600–650 nm pour chaque puits. Lire la plaque dans l'heure qui suit le blocage de la réaction.
10. Calculer les résultats de la façon décrite dans le paragraphe "Instruments et Calcul des Résultats".

REMARQUES CONCERNANT LE MODE OPERATOIRE

1. **Remarque concernant le lavage des plaques :** Les tests immunoenzymétriques exigent un lavage efficace afin d'éliminer les anticorps marqués à la biotine non liés. De ce fait, il est très important de laver efficacement chaque puits en éliminant les dernières gouttelettes de solution de lavage afin d'obtenir les meilleurs résultats.
2. Si un échantillon contient une concentration de BAP supérieure à celle de l'étalon le plus fort, il doit être dilué avec l'Étalon zéro/Diluant et dosé selon le **Procédure** du test. Le facteur de dilution doit être pris en compte dans le calcul des résultats. Chaque échantillon doit être parfaitement homogénéisé avant d'être dosé. Les dilutions recommandées pour les échantillons contenant une concentration de BAP supérieure à celle de l'étalon le plus fort sont 1/3, 1/5 ou 1/10. Toutefois, il est souhaitable de diluer les échantillons sériques dont la concentration en BAP est supérieure à celle de l'étalon le plus fort de façon à ce que la lecture de l'échantillon dilué donne un résultat supérieur à 10 µg de BAP/L.
3. Du fait que l'absorption est fonction de la température et de la durée de l'incubation du réactif substrat, il est très important que cette incubation soit la même pour tous les puits/plaques. Ceci peut être obtenu en s'assurant que le temps écoulé pour le pipetage des réactifs depuis le début jusqu'à la fin, sans interruption, soit exactement le même pour l'étape d'addition du réactif substrat ainsi que pour l'étape d'addition du réactif de blocage. Pour garantir les meilleurs résultats, l'addition de ces réactifs ne doit pas dépasser 90 secondes et l'incubation totale du substrat ne doit pas dépasser 15 minutes.
4. Pour plus de facilité, des pipetteurs à répétition ou multi-canaux peuvent être utilisés pour distribuer le conjugué, la solution de lavage, le substrat et le réactif de blocage. Il est recommandé d'utiliser des pipettes à embout jetable pour pipeter les étalons, les contrôles et les échantillons. L'embout de la pipette doit être changé après le prélèvement de chaque échantillon afin d'éviter toute contamination des réactifs ou des échantillons.
5. Ne pas mélanger les réactifs provenant de trousses ayant des numéros de lot différents.

INSTRUMENTS ET CALCUL DES RESULTATS

Les résultats peuvent être calculés soit en utilisant des techniques assistées par ordinateur soit manuellement sur papier millimétré linéaire.

Technique assistée par ordinateur

Un ajustement de courbe point-par-point est recommandé. Le logiciel point-par-point qui relie au moyen d'une droite les moyennes des doubles des étalons, y compris l'étalon de concentration 0 µg de BAP/L, donne de bons résultats avec la procédure et la technique d'étalonnage décrites.

Pour plus d'informations concernant la réduction des données assistée par ordinateur, consultez votre représentant.

Méthode manuelle

La courbe d'étalonnage du test Ostase BAP peut être construite manuellement sur du papier millimétré linéaire en reportant sur l'axe des ordonnées l'absorption moyenne de chaque étalon, en fonction de leur concentration en BAP portée sur l'axe des abscisses. Une courbe point-par-point doit être tracée en passant par les points des étalons. Ne pas essayer de tracer la courbe selon une ligne droite.

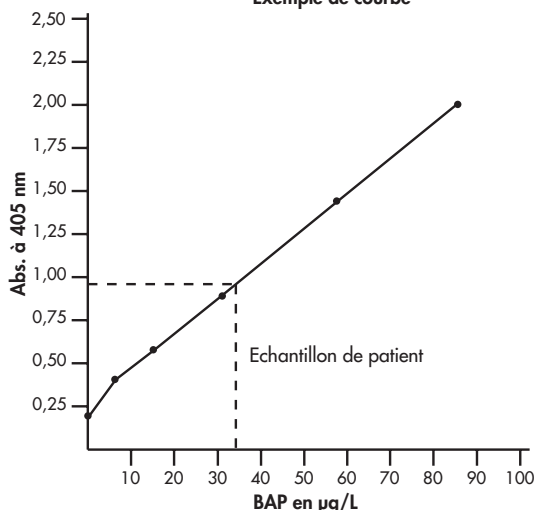
Pour déterminer la concentration en BAP des contrôles et des échantillons de patients, tracer une ligne horizontale depuis la valeur d'absorption de l'échantillon à tester jusqu'à la courbe d'étalonnage. Au point d'intersection de la ligne horizontale avec la courbe, tracer une ligne verticale jusqu'à l'axe des abscisses et lire la concentration de BAP.

Si l'absorption d'une réplique de l'échantillon est supérieure à l'absorption de l'étalon le plus fort, l'échantillon doit être dilué et dosé à nouveau. La concentration obtenue pour l'échantillon dilué doit être multipliée par le facteur de dilution.

Exemple de résultats

Puits N°	Description	Abs. à 405 nm	Abs. moyenne	BAP µg/L
1	Etalon (0)	0,193		
2		0,187	0,190	0,0
3	Etalon (1)	0,401		
4		0,402	0,402	7,2
5	Etalon (2)	0,595		
6		0,572	0,584	15,5
7	Etalon (3)	0,908		
8		0,866	0,887	31,9
9	Etalon (4)	1,499		
10		1,460	1,479	58,4
11	Etalon (5)	2,000		
12		2,051	2,026	85,8
13	Echantillon de patient	0,911		33,0

Exemple de courbe



CONTROLE DE QUALITE ET ACCEPTABILITE DES RESULTATS

Les bonnes pratiques de laboratoire prévoient l'utilisation d'échantillons de contrôle au cours d'une série de dosages pour vérifier si tous les réactifs et protocoles sont conformes. Le coffret Ostase BAP antibody set contient des contrôles qui peuvent être utilisés pour vérifier les performances analytiques du test.

- Le pourcentage de récupération des concentrations des contrôles de la trousse doit se situer dans les limites fixées.
- Le coefficient de variation (CV %) des lectures d'absorption à 405 nm doit être inférieur à 10% pour les étalons et les échantillons de contrôle.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

Interférences des anticorps HAMA : Certaines personnes ont des anticorps dirigés contre la protéine de souris (HAMA) qui peuvent causer des interférences dans les tests immunologiques utilisant des anticorps dérivés de souris. Il a été rapporté, en particulier, que les échantillons de sérum de patients qui ont subi une thérapie ou des procédures de diagnostic faisant appel à l'injection d'un anticorps monoclonal de souris peuvent produire des résultats erronés lors de ces tests. Par conséquent, les résultats du test Ostase BAP, pour de tels patients, doivent uniquement être utilisés en conjonction avec des résultats provenant d'une autre procédure de diagnostic et des informations provenant d'une évaluation clinique du patient.

L'immunoréactivité de la PAL hépatique dans le sérum a été déterminée dans le test Ostase : une activité de la PAL hépatique de 100 U/L donne un résultat de 2,8 à 6,2 µg/L dans le test Ostase BAP. Les échantillons sériques avec des augmentations importantes de l'activité de la PAL hépatique peuvent donner des résultats élevés avec le test Ostase BAP. Les patients atteints de faibles perturbations du métabolisme osseux peuvent avoir des concentrations de BAP se situant dans les valeurs attendues du test Ostase BAP.

Les résultats du test Ostase BAP doivent être utilisés uniquement en conjonction avec les informations disponibles provenant de l'évaluation clinique du patient et d'autres procédures de diagnostic. Par conséquent, il n'est pas recommandé d'utiliser le test Ostase BAP comme procédure de dépistage pour détecter, dans la population générale, la présence d'une ostéoporose. De plus, le test Ostase BAP ne peut pas être utilisé pour évaluer le taux de formation osseuse ou de remodelage osseux.

VALEURS ATTENDUES

Les résultats de BAP présentés dans les paragraphes Valeurs attendues et Etudes cliniques ont été générés avec le test Tandem-R Ostase. Toutefois, une étude de corrélation des tests Ostase BAP et Tandem-R Ostase a démontré une bonne concordance entre les tests ($y = 1,02x + 0,28$, $r = 0,9700$, $n = 136$).

Le test Tandem-R Ostase a été évalué dans des études impliquant des adultes en bonne santé (âgés de 20 à 89 ans), et réparties dans 6 sites. La concentration moyenne en BAP, l'écart-type (ET), la médiane et le percentile 95 pour les hommes (N = 217), les femmes préménopausiques (N = 228) et les femmes postménopausiques (N = 529) sont présentés dans le tableau suivant.

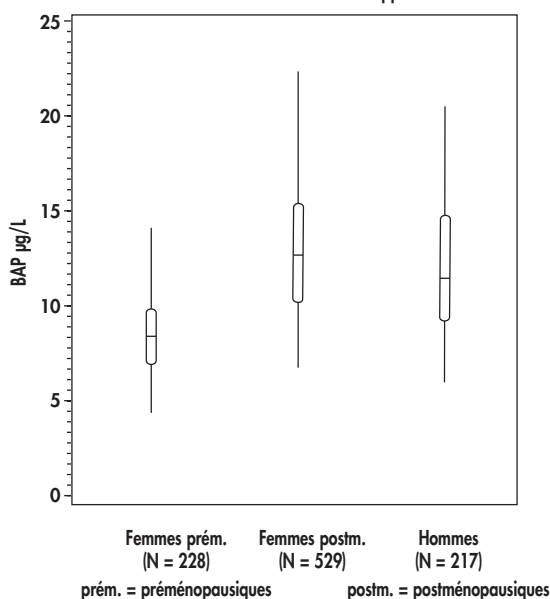
Résumé des concentrations de BAP chez des adultes apparemment en bonne santé*

	N	Moyenne BAP µg/L	ET	Médiane BAP µg/L	Percentile 95 BAP µg/L
Hommes	217	12,3	4,3	11,6	20,1
Femmes préménopausiques	228	8,7	2,9	8,5	14,3
Femmes postménopausiques	529	13,2	4,7	12,5	22,4

*Résultats générés avec le test immunoradiométrique Tandem-R Ostase

Les résultats présentés ci-dessus montrent que les concentrations de BAP dans une population de femmes postménopausiques sont plus élevées que les concentrations de BAP chez les femmes préménopausiques ($p \leq 0,0001$). Cette augmentation de la concentration moyenne de BAP reflète l'augmentation du remodelage osseux associée à un déficit en œstrogènes dans une population postménopausique comparée à une population préménopausique (2,8,12,13). Toutefois, il existe un recouvrement important des concentrations de BAP dans les populations comme le montre la distribution ci-dessous.

Distribution des concentrations de BAP chez des adultes apparemment en bonne santé*



*Résultats générés avec le test immunoradiométrique Tandem-R Ostase

Pour chacune des populations présentées dans le diagramme : 1) Les lignes horizontales dans chacun des cadres représentent les concentrations médianes ; 2) Les marges supérieures et inférieures de chaque cadre représentent les fourchettes interquartiles – c.-à-d., la marge supérieure délimite 25% des valeurs situées au-dessus de la médiane tandis que la marge inférieure délimite 25% des valeurs situées au-dessous de la médiane ; 3) La ligne verticale représente la fourchette comprise entre le percentile 5 et le percentile 95.

Les fourchettes des valeurs obtenues mentionnées ci-dessus sont uniquement représentatives de cette étude et ne reflètent pas nécessairement les fourchettes qui seront obtenues dans un laboratoire clinique particulier. Chaque laboratoire doit établir son propre intervalle de référence.

ETUDES CLINIQUES

Maladie de Paget

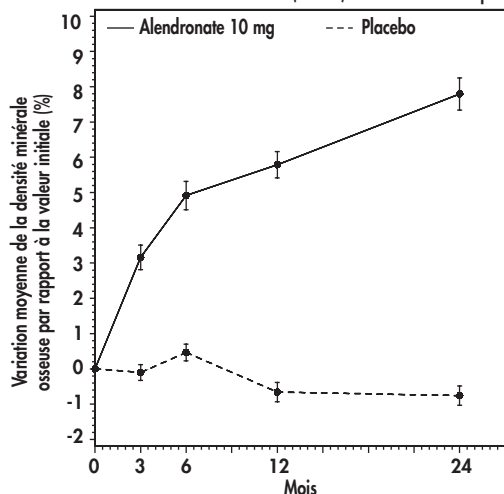
Des études de corrélation ont été effectuées pour comparer les concentrations sériques de BAP obtenues en utilisant le test Tandem-R Ostase aux résultats obtenus en utilisant deux méthodes électrophorétiques actuellement commercialisées et deux tests d'activité enzymatique pour la phosphatase alcaline totale (TAP). Ces études ont été menées dans des sites d'investigation clinique en utilisant 100 échantillons provenant de patients atteints de la maladie de Paget. Le coefficient de corrélation (r) obtenu pour la corrélation entre le test Tandem-R Ostase et les méthodes électrophorétiques est de 0,9418. Le coefficient de corrélation (r) obtenu pour la corrélation entre le test Tandem-R Ostase et les tests d'activité enzymatique de la phosphatase alcaline totale est de 0,9459.

Ostéoporose postménopausique – Traitement par les bisphosphonates

Afin de démontrer la capacité du test Tandem-R Ostase à refléter les altérations du remodelage osseux consécutives au traitement de l'ostéoporose postménopausique, une étude a été menée chez des patientes atteintes d'ostéoporose cliniquement définie et qui étaient traitées aux bisphosphonates (alendronate sodique). Il s'agissait d'une étude multicentrique, prospective, en double aveugle, contrôlée contre un placebo (25). Les données disponibles proviennent de patientes ayant reçu aléatoirement soit un placebo (N = 148), soit de l'alendronate 10 mg (N = 74). De plus, toutes les patientes ont reçu un supplément quotidien de 500 mg de calcium. Des mesures de la densité minérale osseuse ont été effectuées au niveau de la colonne lombaire en utilisant la technique d'absorptiométrie biénergétique aux rayons X. Les dosages en série de la BAP ont été réalisés avec le test Tandem Ostase.

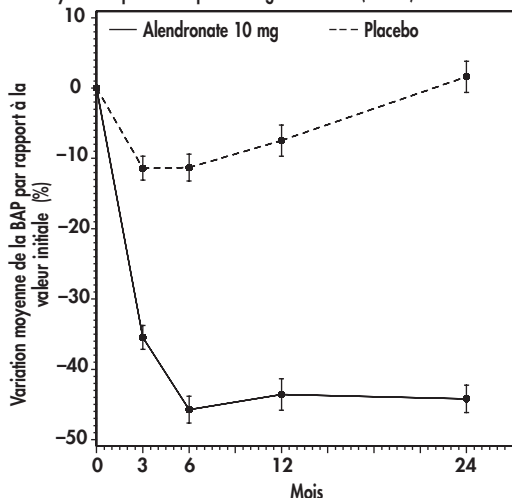
La figure suivante illustre les variations moyennes de la densité minérale osseuse exprimées en pourcentage par rapport à la valeur initiale ainsi que les barres d'erreur standard pour les groupes placebo et alendronate à des intervalles de temps définis. Une augmentation de 7,8% de la densité minérale osseuse par rapport à la valeur initiale est observée dans le groupe alendronate après 24 mois, signifiant ainsi que le traitement aux bisphosphonates a eu un effet positif sur l'os. Comme on pouvait s'y attendre, une diminution de 0,8% de la densité minérale osseuse est observée pour le groupe placebo supplémenté en calcium après 24 mois.

Résultats des groupes alendronate 10 mg et placebo
Variation moyenne exprimée en pourcentage de la densité minérale osseuse au niveau de la colonne lombaire (± 1 ES) en fonction du temps



Un résumé des résultats recueillis pendant deux ans par les dosages en série des concentrations en BAP effectués à l'aide du test Tandem Ostase pour les groupes placebo et alendronate 10 mg est présenté ci-dessous. Les diminutions moyennes exprimées en pourcentage par rapport à la valeur initiale et les barres d'erreur standard sont représentées pour le groupe placebo (valeur initiale de la BAP = 17,7 $\mu\text{g/L} \pm 6,0$) et pour le groupe traité à l'alendronate (valeur initiale de la BAP = 17,0 $\mu\text{g/L} \pm 4,6$) à des intervalles de temps définis. Les résultats montrent une diminution des concentrations de BAP en fonction du temps pour le groupe traité à l'alendronate, atteignant un minimum après 6 mois. Comme on pouvait s'y attendre, une variation légère et transitoire des taux du marqueur est observée dans le groupe placebo supplémenté en calcium (26,27). La diminution suivie d'une stabilisation subséquente des variations de la BAP dans le groupe traité à l'alendronate suggère l'installation d'un nouvel état d'équilibre du remodelage osseux consécutif au traitement par les bisphosphonates (24,28,29).

Résultats des groupes alendronate 10 mg et placebo
Variation moyenne exprimée en pourcentage de la BAP en fonction du temps



Les diminutions des concentrations de BAP observées pour le groupe traité à l'alendronate et mesurées par le test Tandem Ostase sont significativement différentes de la valeur initiale ($p \leq 0,0001$) dès 3 mois de traitement et aux intervalles de temps suivants (6, 12 et 24 mois). Par contre, les concentrations de BAP ont diminué de 11% après 3 mois et 6 mois dans le groupe placebo et sont retournées à la valeur initiale après 24 mois.

Les variations de la BAP et de la densité minérale osseuse, dans cette étude, sont cohérentes avec les connaissances actuelles sur le remodelage osseux et le mécanisme d'action des thérapies anti-ostéoporotiques (24). D'après ces résultats, il est possible d'arriver à la conclusion que la diminution des concentrations de BAP mesurées par le test Tandem Ostase chez les patientes traitées à l'alendronate reflète les modifications du remodelage osseux résultant de la thérapie anti-ostéoporotique.

Pour avoir une signification clinique, le pourcentage de variation entre deux valeurs d'un marqueur sérique doit dépasser à la fois la variation biologique (intra-sujet) du marqueur et la variation analytique du test utilisé. Ce seuil, exprimé en pourcentage, est connu sous le nom de la plus petite variation significative. Les pourcentages de variation d'un marqueur qui dépassent la plus petite variation significative peuvent être attribués à une modification de l'état clinique du sujet, par exemple en réponse à une thérapie (30). La plus petite variation significative d'un marqueur biochimique a été décrite par Soletormos (30) et d'autres auteurs (31) au moyen de la formule :

$$\text{Plus petite variation significative} = \sqrt{2 \times Z \times \sqrt{CV_p^2 + CV_a^2}}$$

où CV_p = variabilité intra-sujet, CV_a = imprécision du test et Z = valeur statistique de Z qui dépend de la probabilité choisie comme seuil de signification et varie selon que la variation attendue est unidirectionnelle ($Z = 1,645$) ou bidirectionnelle ($Z = 1,96$).

La variabilité intra-sujet du test Tandem Ostase a été déterminée à partir d'échantillons sériques, provenant de 17 femmes postménopausiques en bonne santé, prélevés tous les jours sur une période de cinq jours. Le coefficient biologique moyen de variation a été calculé et trouvé à 4,2%.

La variation analytique reposait sur les résultats de la précision inter-essai figurant dans le paragraphe "PERFORMANCES DU TEST" de cette notice.

La plus petite variation significative pour la BAP dosée avec le test Tandem Ostase a été calculée et est de 25%. Par conséquent, les variations des concentrations de BAP dépassant 25% chez les femmes postménopausiques peuvent être attribuées à des modifications du remodelage osseux.

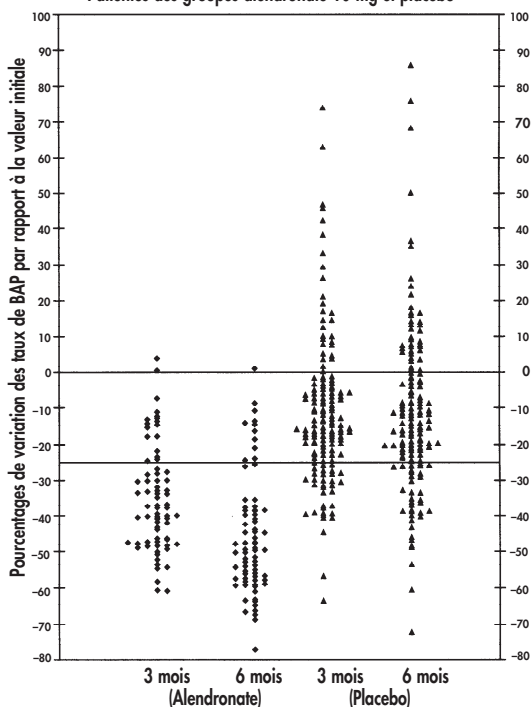
Les pourcentages de variation de la BAP par rapport à la valeur initiale de chaque patiente sont présentés ci-dessous. Les résultats sont donnés pour les sujets du groupe placebo et du groupe alendronate 10 mg après 3 mois et 6 mois de traitement. La ligne horizontale à zéro représente la valeur initiale et la ligne horizontale à -25% représente la plus petite variation significative pour la BAP dosée par le test Tandem Ostase. Pour le groupe alendronate 10 mg, 77,0% (57/74) des patientes présentaient une diminution des taux de BAP de 25% par rapport à la valeur initiale (temps 0) ou supérieure après 3 mois de traitement et 85,1% (63/74) des patientes présentaient une diminution des taux de BAP de 25% par rapport à la valeur initiale ou supérieure lorsque les valeurs atteignent le point le plus bas (6 mois). Après 24 mois, 90,3% (65/72) des patientes présentaient une diminution des taux de BAP de 25% ou plus. Pour le groupe placebo supplémenté en calcium, 75,7% (112/148) des patientes présentaient une diminution des taux de BAP par rapport à la valeur initiale (temps 0) qui était inférieure à 25% (6 mois). Après 24 mois, 88,1% (126/143) des patientes du groupe placebo présentaient une diminution des taux de BAP inférieure à 25%. Ces résultats sont repris en détail dans le tableau ci-dessous. Ce tableau montre le nombre de patientes traitées et le nombre de patientes du groupe placebo (et le pourcentage de patientes) qui présentaient des diminutions des taux de BAP < 25% ou > 25% (respectivement après 3 mois et 6 mois) par rapport à la valeur initiale.

Résumé des pourcentages de variation individuelle des taux de BAP par rapport à la valeur initiale pour les patientes des groupes alendronate 10 mg et placebo
Nombre de patientes/Nombre total de patientes

Valeur seuil des pourcentages de variation des taux de BAP	3 mois		6 mois	
	Placebo N = 148	Alendronate 10 mg N = 74	Placebo N = 148	Alendronate 10 mg N = 74
Diminution de 25% ou supérieure	33/148 (22,3 %)	57/74 (77,0 %)	36/148 (24,3 %)	63/74 (85,1 %)
Diminution inférieure à 25%	115/148 (77,7 %)	17/74 (23,0 %)	112/148 (75,7 %)	11/74 (14,9 %)

Dans le groupe alendronate 10 mg, une diminution moyenne des taux de BAP de 45,7% par rapport à la valeur initiale après 6 mois a été suivie d'une diminution moyenne de la densité minérale osseuse de 7,8% après 24 mois. Inversement, la faible variation des taux de BAP par rapport à la valeur initiale après 6 mois observée pour le groupe placebo supplémenté en calcium (-11,3%) a été accompagnée par une faible diminution de la densité minérale osseuse de -0,8% après 24 mois.

Pourcentages de variation des taux de BAP par rapport à la valeur initiale
Patientes des groupes alendronate 10 mg et placebo



En résumé, il a été démontré que :

1. Les concentrations de BAP reflètent l'augmentation du remodelage osseux associée à un déficit en œstrogènes chez des femmes postménopausiques apparemment en bonne santé.
2. Les concentrations de BAP reflètent les modifications du remodelage osseux qui résultent d'une thérapie anti-ostéoporotique à l'alendronate chez les femmes postménopausiques.
3. Des diminutions cliniquement significatives des concentrations de BAP après 3 mois et 6 mois sont des indicateurs du remodelage osseux. L'efficacité d'un traitement à l'alendronate 10 mg chez les femmes postménopausiques est indiquée par des augmentations de la densité minérale osseuse après 24 mois.
4. Une diminution des taux de BAP de 25% ou plus par rapport à la valeur initiale, mesurée par le test Tandem Ostase, peut indiquer des modifications du remodelage osseux résultant d'un traitement anti-ostéoporotique.

Les patientes soumises à un traitement anti-ostéoporotique à l'alendronate et dont les taux de BAP ne diminuent pas de 25% par rapport à la valeur initiale durant les premiers mois de l'étude doivent être retestées durant les mois suivants. Parmi les 11 patientes qui ont présenté une diminution des taux de BAP inférieure à 25% par rapport à la valeur initiale après 6 mois, 9 d'entre elles ont finalement montré une diminution des taux de BAP supérieure à 25% par rapport à la valeur initiale après 24 mois. Toutes ces patientes ont répondu positivement au traitement à l'alendronate 10 mg, comme l'indiquent les augmentations de la densité minérale osseuse. Les patientes traitées et dont les taux de BAP n'ont pas diminué de 25% par rapport à la valeur initiale doivent être évaluées par d'autres moyens cliniques pour déterminer l'efficacité thérapeutique.

Femmes postménopausiques – Hormonothérapie substitutive

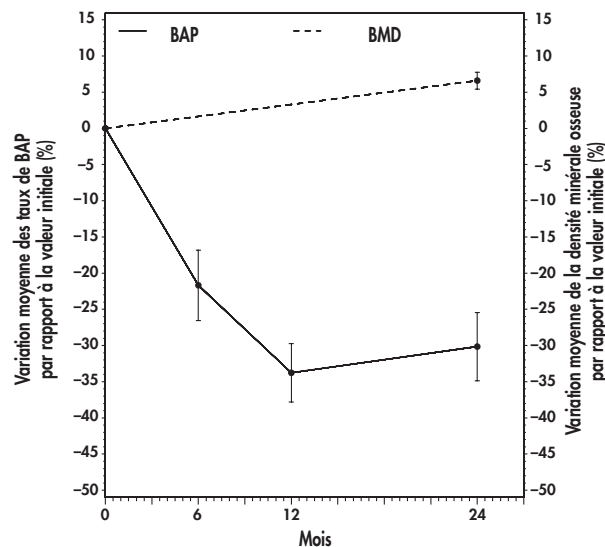
Outre l'étude sur les bisphosphonates décrite ci-dessus, d'autres études ont été instaurées afin de démontrer la capacité du test Tandem Ostase à refléter les altérations du remodelage osseux consécutives à un traitement par des œstrogènes (29,32). Les résultats de l'une de ces études sont présentés ci-dessous. Dans cette étude, des femmes (n = 12) postménopausiques non hystérectomisées apparemment en bonne santé, âgées de 65 à 75 ans, ont reçu quotidiennement un traitement œstrogénostatif (Prémarin 0,625 mg et Provera 2,5 mg) pendant 2 ans. De plus, 6 femmes hystérectomisées en bonne santé ont reçu uniquement des œstrogènes, ce qui donne, pour l'étude, une population totale de 18.

La BAP a été dosée par le test Tandem Ostase au départ (valeur initiale) et après 6, 12 et 24 mois. La densité minérale osseuse a été évaluée au départ (valeur initiale) et après 24 mois.

Les variations moyennes exprimées en pourcentage par rapport à la valeur initiale et les barres d'erreur standard pour la BAP (à gauche de l'axe des ordonnées) et pour la densité minérale osseuse (à droite de l'axe des ordonnées) sont portées sur la figure ci-dessous pour chaque intervalle de temps. Une augmentation de 6,6% de la densité minérale osseuse au niveau de la colonne lombaire par rapport à la valeur initiale est observée pour les patientes traitées par les œstrogènes, indiquant que le traitement aux œstrogènes a eu un effet positif sur l'os. Les résultats présentés sur la figure ci-dessous montrent également une diminution, en fonction du temps, des concentrations de BAP pour le groupe traité, atteignant le point le plus bas après 12 mois. Les diminutions des concentrations de BAP observées pour le groupe traité aux œstrogènes, mesurées par le test Tandem Ostase, sont significativement différentes de la valeur initiale ($p \leq 0,0001$) après 6 mois et durant les mois qui suivent (12 et 24 mois).

Résultats du groupe traité aux œstrogènes

Variation moyenne exprimée en pourcentage par rapport à la valeur initiale (± 1 ES) des taux de BAP et de densité minérale osseuse au niveau de la colonne lombaire en fonction du temps



Les variations des taux de BAP et de densité minérale osseuse de cette étude sont cohérentes avec les connaissances actuelles sur le remodelage osseux et le mécanisme des thérapies anti-œstrogéniques (5,33). D'après ces résultats, il est possible d'arriver à la conclusion que la diminution des concentrations de BAP, mesurée par le test Tandem Ostase, chez les patientes traitées aux œstrogènes reflète les modifications du remodelage osseux résultant de la thérapie anti-ostéoporotique.

Les résultats du test Tandem Ostase doivent être utilisés uniquement en conjonction avec les informations disponibles provenant de l'évaluation clinique du patient et d'autres procédures de diagnostic.

PERFORMANCES DU TEST

Précision intra-essai

La précision intra-essai a été déterminée en dosant quatre pools de sérums contenant des concentrations variées de BAP. Chaque pool de sérums a été dosé en 20 répliques. Les résultats sont présentés ci-dessous.

Pool de sérums	1	2	3	4
Nombre de répliques	20	20	20	20
Moyenne (µg/L)	7,4	27,3	52,7	79,5
Ecart-type	0,48	0,78	1,35	3,54
CV (%)	6,5	2,9	2,6	4,5

Précision inter-essai

La précision inter-essai a été déterminée par des dosages en double de quatre pools de sérums dans une série de 20 tests étalonnés individuellement :

Pool de sérums	A	B	C	D
Nombre de dosages	20	20	20	20
Moyenne (µg/L)	8,4	29,2	55,6	81,1
Ecart-type	0,47	1,88	2,03	4,92
CV (%)	5,8	6,4	3,7	6,1

Récupération et dilution

Diverses quantités d'un échantillon sérique contenant des concentrations élevées de BAP ont été ajoutées à des sérums humains contenant de la BAP endogène et les échantillons ont été dosés en triple.

Addition µg/L	Concentration attendue µg/L	Concentration obtenue µg/L	Pourcentage de récupération*
14,0	24,6	24,8	100,9
39,9	50,5	48,8	96,6
59,2	69,8	66,0	94,6
92,2	102,8	92,6	90,1

* Le pourcentage de récupération est égal à la concentration obtenue divisée par la concentration attendue et multipliée par 100.

Un échantillon de sérum contenant une concentration élevée de BAP a été dilué avec l'Étalon zéro/Diluant et dosé à des dilutions multiples.

Dilution µg/L	Concentration attendue µg/L	Concentration obtenue µg/L	Pourcentage de récupération*
Pur	N/A	54,6	N/A
1/4	27,3	27,9	102,3
1/6	18,2	17,4	95,4
1/8	13,7	12,7	92,8

* Le pourcentage de récupération est égal à la concentration obtenue divisée par la concentration attendue et multipliée par 100.

Substances interférant

- L'**hémoglobine**, qui a été testée à des concentrations maximales de 500 mg/dL, n'interfère pas avec le test Ostase BAP.
- La **bilirubine conjuguée** et la **bilirubine non conjuguée**, qui ont été testées à des concentrations maximales respectives de 40 mg/dL et 20 mg/dL, n'interfèrent pas avec le test Ostase BAP.
- Les **triglycérides**, qui ont été testés à des concentrations maximales de 2000 mg/dL, n'interfèrent pas avec le test Ostase BAP.
- Les **protéines totales**, qui ont été testées à des concentrations comprises entre 3 et 14 g/dL n'interfèrent pas avec le test Ostase BAP.
- 100 U/L de PAL intestinale donnent un résultat de 1,0 µg/L dans le test Ostase BAP.
- 100 U/L de PAL placentaire n'ont donné aucun résultat détectable dans le test Ostase BAP.

Réactivité de la PAL hépatique

La réactivité de la PAL hépatique a été déterminée dans le test Ostase BAP en utilisant des échantillons sériques de patients atteints d'une maladie hépatique et d'échantillons sériques de patients atteints de la maladie de Paget. Les échantillons ont été testés par électrophorèse et il a été montré qu'ils contenaient plus de 95% de PAL hépatique ou de BAP.

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer la réactivité de la PAL hépatique. La première procédure, décrite par Moss et Whitby (35), utilisait une méthode d'inactivation par la chaleur qui minimise la contribution de la BAP endogène dans les échantillons qui contiennent des taux élevés de PAL hépatique. Avec cette méthode, une activité de 100 U/L de PAL hépatique a donné un résultat de 2,8 à 3,4 µg/L dans le test Ostase BAP.

La seconde procédure, décrite par Price et al. (36), utilisait une méthode de pente (test Ostase BAP comparé à la PAL totale), où les échantillons n'ont pas été prétraités. Dans cette étude, le dosage des échantillons PAL hépatique et BAP (axe des ordonnées) a été tracé en fonction de l'activité de la PAL totale (axe des abscisses) contenue dans chaque échantillon. D'après les valeurs de la pente des échantillons PAL hépatique et BAP, il a été déterminé que :

- 100 U/L d'activité de PAL hépatique a donné un résultat de 6,3 µg/L dans le test Ostase BAP ;
- 100 U/L d'activité de BAP a donné un résultat de 36,9 µg/L dans le test Ostase BAP.

Substances interférant

Différentes concentrations de substances ont été ajoutées à trois pools de sérums différents contenant de la BAP et dosés en quadruple. Les substances ajoutées et leurs plus fortes concentrations testées sont indiquées ci-dessous. Le dosage était basé sur la directives NCCLS EP-7P (Analyse des interférences dans les tests cliniques).

paracétamol	20 mg/dL
alendronate	5 mg/dL
aspirine	50 mg/dL
calcitonine de saumon	112 U/dL
calcium	20 mg/dL
œstrogène	400 ng/dL
étidronate	105 mg/dL
ibuprofène	40 mg/dL
pamidronate	18 mg/dL
progestérone	25 mg/dL
vitamine D	80500 U/dL

Ces substances n'ont pas interféré avec la récupération de la BAP provenant des pools de sérums dans le test Ostase BAP.

Concentration minimale détectable

Dans le test Ostase BAP, la concentration minimale détectable de BAP a été estimée à 0,7 µg de BAP/L. La concentration minimale détectable est définie comme la concentration de BAP correspondant à l'absorption qui est deux écarts-types supérieure à l'absorption moyenne des 20 déterminations des répliques de l'Étalon zéro/Diluant.

L'utilisation de ce coffret est autorisée sous les licences U.S.A. n° 4,376,110 et 4,486,530. Tandem® et Ostase® sont des marques déposées de Hybritech Incorporated, une filiale de Beckman Coulter, Inc.

*Tween est une marque déposée de ICI Americas, Inc.

Ostase® BAP

Ensayo inmunoenzimático



Para la determinación cuantitativa de la Fosfatasa Alcalina Específica de los huesos (BAP) en suero humano

INDICACIONES

El ensayo inmunoenzimático Ostase BAP es un mecanismo *in vitro* para la determinación cuantitativa de la fosfatasa alcalina específica de los huesos (BAP), un indicador de actividad osteoblástica, en el suero humano. El uso previsto de este mecanismo es como ayuda en el manejo de la osteoporosis posmenopáusica y de la enfermedad de Paget.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El hueso es un tejido dinámico en el cual la formación y la eliminación de hueso (lo que se conoce como resorción) continúa a lo largo de toda la vida en un proceso que se denomina remodelado. El proceso de remodelado es una función de interacciones complejas que tienen lugar entre dos tipos de células óseas: los osteoblastos que se encargan de la formación del hueso y los osteoclastos que se encargan de su resorción (1-3). La formación y resorción ósea son procesos interdependientes que, en circunstancias normales, están estrechamente conectados (2,4). Esta relación de conexión es esencial para mantener la competencia bioquímica del esqueleto, preservando la organización de la estructura, forma y fortaleza del hueso (2,3,5).

Se cree que los niveles de BAP son un reflejo del estado metabólico de los osteoblastos (6,7). Para determinar la severidad de la enfermedad metabólica ósea y las respuestas a la terapia es esencial una valoración exacta del metabolismo óseo. Se ha demostrado que la determinación de las concentraciones séricas de BAP es útil en la evaluación de pacientes con enfermedad de Paget, osteomalacia, hiperparatiroidismo primario, osteodistrofia renal, osteoporosis y metástasis óseas (6-10). La determinación de la fosfatasa alcalina total es el método aceptado para establecer el diagnóstico y para hacer el seguimiento de los pacientes con enfermedad de Paget.

La enfermedad ósea de Paget es un trastorno esquelético frecuente en el cual se produce una proliferación focal de los componentes celulares normales del hueso. La enfermedad de Paget es más prevalente de lo que antiguamente se creía, con una tasa de incidencia en ciertas poblaciones que llega al 3%-4% en los pacientes de mediana edad y al 10%-15% en la población anciana (11). Esta enfermedad no afecta a las personas jóvenes. La mayoría de los pacientes con enfermedad de Paget no presentan síntomas por lo que, a menudo, permanecen sin diagnosticar hasta que durante una evaluación médica por motivos no relacionados con el trastorno se encuentren pruebas radiográficas o concentraciones de fosfatasa alcalina séricas anormales. Las quejas más frecuentes en los pacientes sintomáticos son el dolor y la deformidad.

El riesgo de osteoporosis, otro de los trastornos del remodelado óseo, depende en parte del desarrollo del esqueleto, la consecución de una masa ósea pico, y posteriormente, de la cantidad de hueso perdido. En niños sanos, la formación de hueso está favorecida respecto de la resorción ósea, lo que da lugar al desarrollo de los huesos y al crecimiento normal del esqueleto (3). En las personas adultas sanas, la formación de hueso y la resorción ósea están equilibradas, con lo que no se produce aumento ni disminución neta en la masa esquelética. Con el paso de los años, hombres y mujeres experimentan un desequilibrio en el remodelado óseo en el cual la resorción es ligeramente mayor que la formación, produciéndose una pérdida neta continuada de masa ósea según van pasando los años (1,2,4,12). Si el desequilibrio persiste, la masa ósea puede disminuir hasta el punto en que el esqueleto sea insuficiente para soportar las tensiones mecánicas normales, haciéndose anormalmente susceptible a las fracturas. La pérdida excesiva de masa ósea junto con un aumento en la susceptibilidad a las fracturas constituye un trastorno que se conoce como osteoporosis (5).

La forma más común de osteoporosis es la que se produce en las mujeres posmenopáusicas y es el resultado de una deficiencia de estrógenos (2,12,13). La pérdida rápida de hueso acompaña al descenso en los niveles de estrógenos que se produce al comienzo de la menopausia, o como resultado de la extirpación quirúrgica de los ovarios. La pérdida rápida de hueso tiene lugar como resultado de los efectos combinados de un desequilibrio en el remodelado óseo y de un aumento en el recambio óseo (5,14-16). En los Estados Unidos, la osteoporosis afecta a unos 25 millones de mujeres posmenopáusicas y es la causa de aproximadamente 1,5 millones de fracturas anuales que incluyen aproximadamente 500.000 fracturas por aplastamiento vertebral, 250.000 fracturas de cadera y 200.000 fracturas del radio distal (2,5,17).

La terapia hormonal sustitutiva es en la actualidad la terapia más frecuentemente prescrita para prevenir las fracturas osteoporóticas en mujeres posmenopáusicas (4,5,18-20). Sin embargo, son muchas las mujeres que no pueden, o no desean, aprovecharse de la terapia hormonal sustitutiva debido a su potencial para aumentar el riesgo de cáncer y porque provoca la reanudación de los ciclos menstruales. Por este motivo, para tratar la osteoporosis se han desarrollado otros compuestos como por ejemplo los bifosfonatos, un tratamiento estándar para la enfermedad de Paget. Las propiedades antiresorptivas de los bifosfonatos disminuyen el remodelado óseo y, por consiguiente, disminuyen la pérdida global de hueso.

Los marcadores bioquímicos son útiles en el seguimiento de la enfermedad ósea metabólica. En el seguimiento de la enfermedad de Paget se han utilizado la hidroxiprolina urinaria y la fosfatasa alcalina sérica total. Sin embargo, la osteoporosis representa una modificación más sutil del proceso de remodelado óseo; por ello, es necesario disponer de marcadores más específicos y sensibles.

El ensayo Ostase BAP es un mecanismo *in vitro* para la determinación cuantitativa de la fosfatasa alcalina específica de los huesos (BAP) en el suero humano. Se ha demostrado que los cambios de BAP son útiles en los pacientes que están recibiendo tratamiento para los trastornos metabólicos del hueso (6,7,10,21,22).

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Ostase BAP es un ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales en una fase sólida. Se hacen reaccionar muestras que contienen BAP con una disolución que contiene un anticuerpo monoclonal específico para BAP y marcado con biotina. La reacción tiene lugar en tiras de pocillos de

plástico (fase sólida) recubiertas con estreptavidina y contenidas en un marco de plástico. Tras la formación de un complejo de la fase sólida/anticuerpo de captura/BAP, se lava la microplaca para eliminar la BAP no fijada y seguidamente se incuba con un sustrato enzimático. La cantidad de recambio del sustrato se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia de la reacción interrumpida en 405 nm en un lector de microplacas. La absorbancia es proporcional a la concentración de BAP presente en la muestra problema. El cálculo de la concentración de BAP se basa en la realización de pruebas concurrentes de calibradores de BAP y del Calibrador Cero/diluyente.

INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO

Componentes	Nº Cat. AC-20F1 96 Pruebas
Conjugado [CONJ] Anti-BAP (IgG monoclonal murina) con biotina, matriz de proteínas bovinas-equinas con 0,09% de azida sódica.	1 x 14 mL
Microplacas [MICROPLAT] Tiras de pocillos de plástico recubiertos de estreptavidina en una bandeja de plástico. Desecante: gel de sílice.	1 x 96 pocillos
Calibrador Cero/diluyente (0) [CAL 0] Matriz de proteínas bovinas sin concentración detectable de BAP (0 µg BAP/L) y 0,09% de azida sódica.	1 x 14 mL
Calibradores (1-5) [CAL 1 - 5] Matriz de proteínas bovinas conteniendo aproximadamente 7, 15, 30, 60 y 90 µg de BAP humana/L y 0,09% de azida sódica. Para los valores asignados, consultar la tarjeta de calibración.	5 x 1 mL
Control bajo (1) [CTRL 1] Matriz de proteínas bovinas conteniendo aproximadamente 11 µg de BAP humana/L y 0,09% de azida sódica. Para los rangos asignados, consultar la informe de control de calidad.	1 x 1 mL
Control alto (2) [CTRL 2] Matriz de proteínas bovinas conteniendo aproximadamente 45 µg de BAP humana/L y 0,09% de azida sódica. Para los rangos asignados, consultar la informe de control de calidad.	1 x 1 mL
Concentrado de lavado [WASHBUF 20X] Solución salina tamponada con fosfato y que contiene Tween.	1 x 50 mL
Sustrato [SUBS]pNPP p-Nitrofenilfosfato en solución tampón estabilizante conteniendo conservantes.	1 x 20 mL
Reactivo de interrupción [NaOH] Hidróxido de sodio 1 N.	1 x 14 mL
Informe de control de calidad, Prospecto	1 de cada

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. **Uso diagnóstico *in vitro* exclusivamente.**
2. **No pipetear con la boca.**
3. **No comer, beber ni fumar en las áreas de trabajo designadas.**
4. **Lavarse las manos concienzudamente después de manipular las muestras y los reactivos del kit.**
5. Algunos componentes de este kit contienen material de origen humano que ha sido analizado utilizando métodos aprobados por la FDA y que ha resultado ser negativo para anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2), anticuerpos frente al virus de la Hepatitis C y frente al antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg). Debido a que ninguno de los métodos conocidos puede ofrecer garantía plena en cuanto a la ausencia de VIH-1, VIH-2, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C u otros agentes infecciosos conocidos, **manejar los reactivos como si fueran potencialmente infecciosos** (23).
6. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Al eliminar cualquiera de estos reactivos, purgar con cantidades copiosas de agua para impedir la acumulación de la azida (24).
7. El Reactivo de interrupción de este kit contiene NaOH 1N, un corrosivo que puede provocar quemaduras. Evitar el contacto con la piel y los ojos. No ingerir ni inhalar. Utilizar gafas de seguridad, guantes y bata blanca mientras se esté trabajando en el laboratorio.
8. **Evitar la contaminación microbiana de reactivos al retirar alícuotas de los viales.**

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Los reactivos del ensayo Ostase BAP deben almacenarse entre 2 y 8°C, a cuya temperatura son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del envase.
- La solución de Lavado y el Reactivo de interrupción son estables entre 2 y 30°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de los frascos.
- Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente (18–25°C) antes de su uso. Una vez utilizados, todos los reactivos a excepción de la solución de Lavado deben almacenarse entre 2 y 8°C.
- La recuperación de las concentraciones del kit de control debe estar dentro de los límites indicados.
- Las tiras de pocillos no utilizados deberán volver a ponerse en las bandejas de almacenamiento de plástico con la bolsa de desecante que se incluye y almacenarse entre 2 y 8°C.
- No utilizar los componentes del kit pasada la fecha de caducidad.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- No se requiere preparación especial del paciente.
- Debe obtenerse una muestra de sangre total utilizando una técnica médica aceptable.
- Esperar a que la sangre se coagule y separar el suero por centrifugación.
- Las muestras deben obtenerse de manera que se evite la hemólisis.
- La muestra que se requiere para el ensayo Ostase BAP es el suero. No se ha establecido el rendimiento del ensayo con muestras plasmáticas.
- Si la muestra de suero debe analizarse en las 24–48 horas siguientes a su obtención, la muestra debe conservarse en un refrigerador entre 2 y 8°C.
- Congelar las muestras que deben conservarse durante tiempos más prolongados (hasta 2 meses) a –70°C.
- Las muestras de suero turbias o que contengan partículas deben centrifugarse antes de ser analizadas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Pipeteadores de precisión de puntas desechables: volumen fijo o ajustable para 50, 100 y 150 µL (± 1%). Opcionalmente, se puede utilizar una pipeta de precisión multicanal junto con cubetas en forma de V desechables para la adición de los reactivos de conjugado, sustrato e interrupción del ensayo anti-BAP
- Puntas de pipeta desechables para 50, 100 y 150 µL
- Tubos de ensayo para diluciones de muestras
- Lavador de microplacas
- Dispositivo de aspiración
- Agua destilada
- Temporizador
- Recipiente para almacenar la solución de Lavado
- Lector de microplacas (longitud de onda primaria 405 nm, sustracción de fondo 600–650 nm) y programa informático de reducción de datos.
- Dispositivo de rotación horizontal de microplacas (intervalo de 500 a 900 rpm)

Si desea más información sobre un sistema completo de manipulación de reactivos, sistema de reducción de datos y dispositivos para manipulación de líquidos, póngase en contacto con el representante local.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Esperar a que todos los reactivos estén a temperatura ambiente (entre 18 y 25°C) antes de utilizarlos.
- Mezclar bien los reactivos antes de cada uso mediante agitación suave o inversión.
- Para evitar la contaminación utilizar una punta de pipeta limpia para cada muestra, calibrador o control.
- Solución de Lavado: Para preparar la solución de Lavado, añadir Concentrado de lavado a 950 mL de agua destilada y mezclar.

PROCEDIMIENTO

- El procedimiento del ensayo Ostase BAP se realiza a temperatura ambiente. Esperar a que todas las muestras séricas y los componentes del kit estén a temperatura ambiente (18–25°C) y mezclar bien antes de su uso.
- Todos los calibradores Cero/Diluyentes, calibradores y controles deben analizarse por duplicado en el mismo soporte de placas.
- Debido a que la interrupción de cada incubación detiene una reacción en curso (es decir, la unión del anticuerpo o el recambio del sustrato), la calibración fiable del ensayo depende de que se pueda garantizar que los tiempos de incubación son esencialmente los mismos para todos los pocillos.

A continuación se indica el procedimiento del ensayo:

1. Etiquetar las tiras de pocillos/soportes adecuadamente y cargar las tiras en el bastidor del soporte. En cada ensayo, procesar por duplicado cada uno de los 6 calibradores y los controles del nivel bajo y del nivel alto.
2. Pipetear 50 µL de Calibrador Cero/calibradores B-F/controles/muestras de pacientes en el fondo de cada pocillo asignado.
3. Pipetear 100 µL de conjugado en cada pocillo.
4. Incubar durante 1 hora a 18–25°C utilizando un dispositivo de rotación horizontal fijado en 500 a 900 rpm.
5. Lavar los pocillos de la microplaca 3 veces:
 - a. Aspirando el líquido de la primera tira.
 - b. Pipeteando 300 µL de solución de Lavado en la primera tira.
 - c. Repitiendo los pasos a y b en todas las demás tiras.
 - d. Repitiendo los pasos a y c dos veces.
6. Dispensar 150 µL de reactivo Sustrato en cada pocillo. Pasar al siguiente paso sin demora.
7. Incubar durante 13–15 minutos a 18–25°C utilizando un dispositivo de rotación horizontal fijado en 500 a 900 rpm. Pasar al siguiente paso sin demora.
8. Dispensar 100 µL de Reactivo de interrupción en cada pocillo.
9. Leer la absorbancia de cada pocillo en 405 nm en un lector de microplacas, restando una lectura en blanco en 600–650 nm para cada pocillo. Leer la placa antes de que pase 1 hora desde la interrupción de la reacción.
10. Calcular los resultados en la forma en que se describe en "Instrumentación y cálculo de resultados".

COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. **Nota sobre el Lavado de placas:** Los ensayos inmunoenzimáticos requieren de un lavado eficiente para eliminar el anticuerpo marcado con biotina no fijado. Por lo tanto, para lograr unos resultados óptimos, es muy importante lavar cada pocillo eficientemente, eliminando las últimas gotitas de la solución de lavado.
2. En caso de encontrarse que una muestra contiene BAP a niveles superiores a los del calibrador más alto, la muestra debe diluirse con el Calibrador Cero/diluyente y ensayarse de acuerdo con el **Procedimiento** del ensayo. El factor de dilución debe incorporarse al cálculo de resultados. Las muestras diluidas deben mezclarse minuciosamente antes de ser analizadas. Las diluciones recomendadas para las muestras que contienen niveles de BAP superiores al calibrador más alto son 1:3, 1:5 ó 1:10. Sin embargo, es aconsejable diluir las muestras de suero que contienen niveles de BAP superiores al calibrador más alto de manera que la lectura de la muestra diluida sea mayor que 10 µg de BAP/L.
3. Debido a que la absorbancia es una función de la temperatura y de la duración de la incubación del reactivo Sustrato, es muy importante que dicha incubación sea la misma en todos los pocillos/placas. Esto se puede lograr garantizando que el tiempo transcurrido en el pipeteo de los reactivos desde que se inicia hasta que se termina (sin interrupción) sea exactamente el mismo tanto en el paso de adición del reactivo Sustrato como en el paso de adición del Reactivo de interrupción. Para garantizar los mejores resultados, la adición de estos reactivos no debe exceder de 90 segundos y la incubación total del sustrato no debe exceder de 15 minutos.
4. Por comodidad, se pueden utilizar pipeteadores multicanal o de repetición para dispensar el conjugado del ensayo, la solución de Lavado, el reactivo Sustrato y el Reactivo de interrupción. Para pipetear los calibradores, los controles y las muestras se recomienda utilizar pipetas con puntas desechables. Las puntas de pipeta deben cambiarse después de pipetear cada muestra para evitar una potencial contaminación cruzada de los reactivos o las muestras.
5. No mezclar materiales de lotes de kit diferentes.

INSTRUMENTACIÓN Y CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Los resultados se pueden calcular utilizando métodos asistidos por ordenador o manualmente sobre papel milimetrado.

Método asistido por ordenador

Se recomienda utilizar un ajuste de curva punto a punto. El programa punto a punto traza una recta entre las medias de las réplicas del calibrador, incluyendo el calibrador 0 µg de BAP/L, y proporciona buenos resultados con el procedimiento y el método de calibración descrito. Para ver información adicional sobre la reducción de datos asistida por ordenador, consulte con su delegado de ventas local.

Método manual

La curva de calibración de Ostase BAP se puede construir manualmente sobre papel milimetrado pasando a una gráfica la absorbancia promedio de cada calibrador en el eje de ordenadas (eje y) frente a la concentración de BAP en el eje de abscisas (eje x). La curva punto a punto debe trazarse utilizando los puntos de calibración. No forzar la curva para convertirla en línea recta.

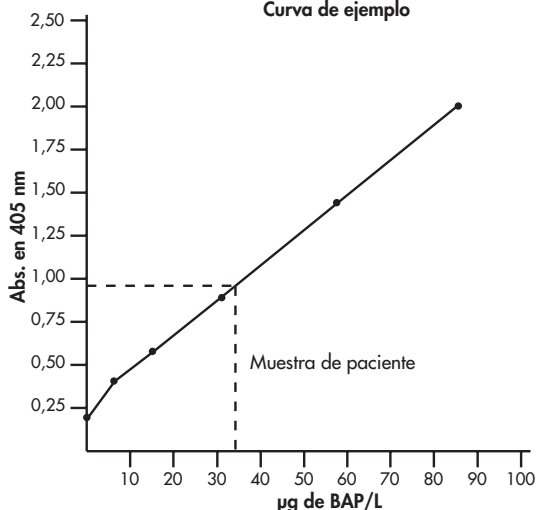
Para determinar la concentración de BAP en los controles y en las muestras de pacientes, extender una línea horizontal desde el valor de la absorbancia correspondiente a la muestra en ensayo hasta la curva de calibración. En el punto de intersección de la línea horizontal y la curva, tirar una línea vertical al eje de abscisas y leer la concentración de BAP.

Si la absorbancia de cualquier réplica de la muestra es mayor que la absorbancia del calibrador más alto, la muestra debe diluirse y volver a ensayarse. La concentración observada de la muestra diluida debe multiplicarse por el factor de dilución.

Ejemplo de datos

Pocillo n°	Descripción	Abs. 405 nm	Abs. media	BAP µg/L
1	Calibrador (0)	0,193		
2		0,187	0,190	0,0
3	Calibrador (1)	0,401		
4		0,402	0,402	7,2
5	Calibrador (2)	0,595		
6		0,572	0,584	15,5
7	Calibrador (3)	0,908		
8		0,866	0,887	31,9
9	Calibrador (4)	1,499		
10		1,460	1,479	58,4
11	Calibrador (5)	2,000		
12		2,051	2,036	85,8
13	Muestra de paciente	0,911		33,0

Curva de ejemplo



CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

Las buenas prácticas de laboratorio incluyen el uso de muestras de control en cada ensayo que se procesa para garantizar que todos los reactivos y protocolos se ejecutan adecuadamente. El conjunto de Anticuerpos de Ostase BAP contiene controles que se pueden utilizar para verificar el rendimiento del ensayo.

1. La recuperación de las concentraciones control debe estar dentro de los límites indicados.
2. El coeficiente de variación (% CV) de las lecturas de absorbancia en 405 nm de cada calibrador y muestra control debe ser inferior al 10%.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Interferencia HAMA: Algunos individuos tienen anticuerpos a la proteína de ratón (HAMA), que pueden provocar interferencias en los inmunoensayos que emplean anticuerpos derivados de ratón. En particular se ha comunicado que las muestras séricas de pacientes que han sido sometidos a terapia o procedimientos diagnósticos que incluyen la perfusión de anticuerpos monoclonales de ratón pueden ocasionar resultados erróneos en estos ensayos. Por lo tanto, los resultados de Ostase BAP de dichos pacientes deberán utilizarse sólo en conjunción con resultados de otros procedimientos diagnósticos y con la información disponible de la evaluación clínica del paciente.

Se ha determinado la inmunoreactividad de la ALP hepática en el ensayo Ostase BAP: 100 U/L de actividad de ALP hepática da un resultado de 2,8 a 6,2 µg/L en el ensayo Ostase BAP. Las muestras séricas con elevaciones significativas de la actividad ALP hepática pueden producir resultados elevados en el ensayo Ostase BAP. Los pacientes con trastornos metabólicos del hueso que tienen niveles bajos de actividad de la enfermedad pueden presentar niveles de ALP específica de los huesos que estén dentro de los valores esperados en el ensayo Ostase BAP.

Los resultados de Ostase BAP deben utilizarse solamente con conjunción con la información disponible de la evaluación clínica del paciente y con resultados de otros procedimientos diagnósticos. Por lo tanto, no se recomienda utilizar el ensayo Ostase BAP como procedimiento de selección para detectar la presencia de osteoporosis en la población general. El ensayo Ostase BAP tampoco se puede utilizar para valorar la tasa de formación de hueso o de remodelado óseo.

VALORES ESPERADOS

Los resultados de BAP que se presentan en las secciones de Valores esperados y Estudios clínicos se generaron con el ensayo Tandem-R Ostase. Sin embargo, un estudio de correlación entre los ensayos Ostase BAP y Tandem-R Ostase demostró una buena concordancia entre los ensayos ($y = 1,02x + 0,28$, $r = 0,9700$, $n = 136$).

El ensayo Tandem-R Ostase se evaluó en estudios en los que participaron adultos aparentemente sanos (de 20 a 89 años de edad) realizados en 6 centros de ensayo. En la tabla siguiente se presenta la concentración media de BAP, la desviación estándar (DE), la mediana, los percentiles 95 para varones (N = 217), para mujeres premenopáusicas (N = 228), y para mujeres posmenopáusicas (N = 529).

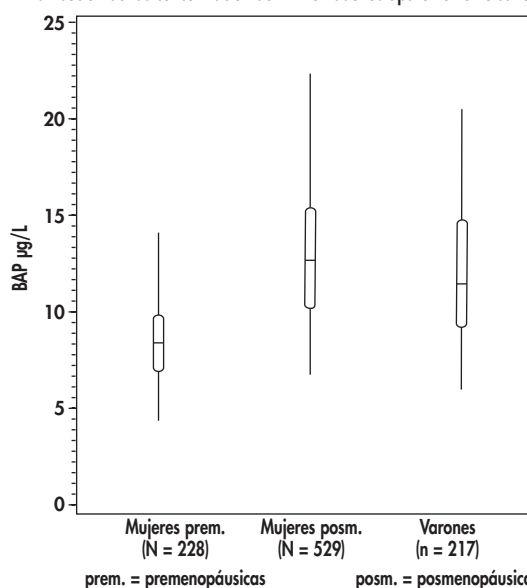
Resumen de las concentraciones de BAP en adultos aparentemente sanos*

	N	BAP Media µg/L	DE	BAP Mediana µg/L	BAP Percentil 95 µg/L
Varones	217	12,3	4,3	11,6	20,1
Mujeres Pre-menopáusicas	228	8,7	2,9	8,5	14,3
Mujeres Pos-menopáusicas	529	13,2	4,7	12,5	22,4

* Resultados generados con el ensayo inmunoquímico Tandem-R Ostase

Los resultados que se presentan en la tabla muestran que las concentraciones medias de BAP en una población de mujeres posmenopáusicas están más elevadas que las concentraciones medias de BAP en mujeres premenopáusicas ($p \leq 0,0001$). Este aumento en la BAP media refleja el aumento en el remodelado óseo que se asocia con la deficiencia estrogénica en la población posmenopáusica en comparación con la población premenopáusica (2,8,12,13). Sin embargo, existe una considerable superposición en las concentraciones de BAP en las poblaciones que se muestran en la distribución que se presenta a continuación.

Distribución de las concentración de BAP en adultos aparentemente sanos*



* Resultados generados con el ensayo inmunoquímico Tandem-R Ostase

En cada una de las poblaciones que se muestran en el gráfico: 1) Las líneas horizontales en cada recuadro representan la mediana de las concentraciones. 2) Los márgenes superior e inferior de cada recuadro representan los intervalos intercuartiles; es decir, el margen superior delimita el 25% de los valores por encima de la mediana mientras que el margen inferior delimita el 25% de los valores por debajo de la mediana. 3) La punta de cada patilla inferior representa la concentración en el percentil 5, mientras que la punta de cada patilla superior representa la concentración en el percentil 95.

Los intervalos de las observaciones comunicadas en el gráfico anterior son representativos de este estudio solamente, y no reflejan necesariamente los intervalos que se observarán en un laboratorio clínico en particular. Cada laboratorio deberá establecer su propio intervalo de referencia.

ESTUDIOS CLÍNICOS

Enfermedad de Paget

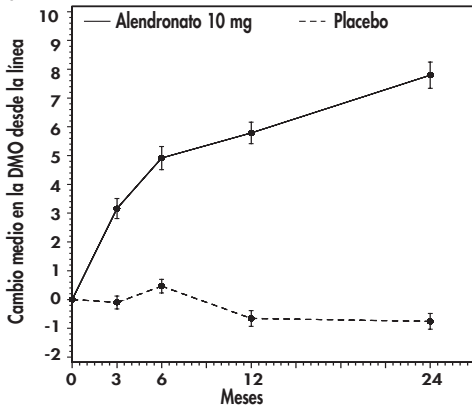
Se realizaron estudios de correlación para comparar las concentraciones séricas de BAP obtenidas utilizando el ensayo Tandem-R Ostase con los resultados obtenidos utilizando dos métodos electroforéticos actualmente comercializados y dos ensayos de actividad enzimática para fosfatasa alcalina total (TAP). Estos estudios se llevaron a cabo en centros de investigación clínica utilizando 100 muestras de pacientes con enfermedad de Paget. El coeficiente de correlación (r) obtenido entre el ensayo Tandem-R Ostase y los métodos electroforéticos es de 0,9418. El coeficiente de correlación (r) obtenido para la correlación entre Tandem-R Ostase y los ensayos de actividad enzimática de fosfatasa alcalina total es de 0,9459.

Osteoporosis posmenopáusicas – Tratamiento con bifosfonato

Con el fin de demostrar la capacidad del ensayo Tandem-R Ostase para reflejar alteraciones en el remodelado óseo en respuesta a la terapia en la osteoporosis posmenopáusicas, se llevó a cabo un estudio en pacientes con osteoporosis clínicamente definida que estaban siendo tratadas con un bifosfonato (alendronato sódico). Este estudio fue un ensayo multicéntrico, prospectivo, doble ciego, controlado con placebo (25). En estos momentos se dispone de datos de sujetos que fueron aleatorizadas para recibir placebo ($N_{\text{pl}}=n_{\text{pl}}148$) o 10 mg de alendronato ($N = 74$). Todas las sujetas tomaron 500 mg de suplementos de calcio al día. Las medidas de densidad mineral ósea (DMO) se tomaron en la columna lumbar utilizando un absorciómetro por rayos x de energía dual. Las determinaciones seriadas de BAP se hicieron con el ensayo Tandem Ostase.

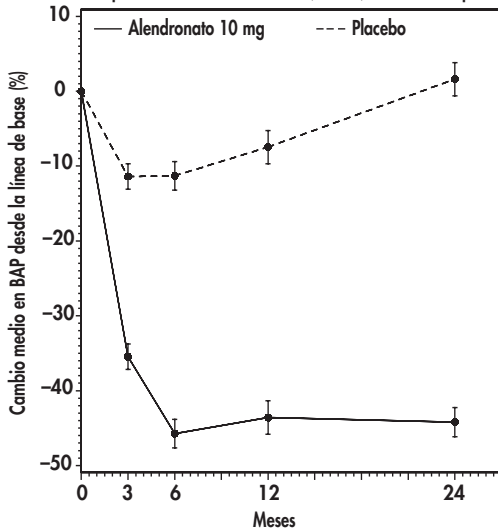
En la figura siguiente, los porcentajes del cambio medio desde la línea de base y las barras de error estándar para la DMO en los grupos placebo y tratado se representan gráficamente en cada punto de valoración. En el grupo alendronato, a los 24 meses se observa un aumento del 7,8% en la DMO respecto de la línea de base, lo que indica que la terapia con el bifosfonato ha tenido un efecto positivo sobre el hueso. Tal como se esperaba, en el grupo placebo suplementado con calcio se observa un descenso del 0,8% en la DMO a los 24 meses.

Datos de los grupos 10 mg de alendronato y placebo
Porcentaje de cambio medio en la DMO en la columna lumbar (± 1 DE) frente al tiempo



A continuación se presenta un resumen de los datos de dos años que incluye las concentraciones seriadas de BAP medidas con el ensayo Tandem Ostase correspondientes a los grupos placebo y 10 mg de alendronato. En cada punto de valoración se pasan a una gráfica el porcentaje medio de descenso desde la línea de base y las barras de error estándar para BAP correspondientes a los grupos placebo ($BAP_{\text{basal}}=17,7 \mu\text{g/L} \pm 6,0$) y tratado con alendronato ($BAP_{\text{basal}}=17,0 \mu\text{g/L} \pm 4,6$). Los datos muestran un descenso dependiente del tiempo en las concentraciones de BAP en el grupo tratado con alendronato, que alcanzan un nadir a los 6 meses. Tal como se esperaba, en el grupo placebo suplementado con calcio se observa un cambio pequeño y transitorio en los niveles del marcador (26,27). El descenso y la posterior estabilización de los cambios en BAP en el grupo tratado con alendronato sugieren que, como resultado del tratamiento con bifosfonato, se produce un nuevo estado de equilibrio en el remodelado óseo (24,28,29).

Datos de los grupos 10 mg de alendronato y placebo
Porcentaje de cambio medio en BAP (± 1 DE) frente al tiempo



Los descensos observados en las concentraciones de BAP en el grupo tratado con alendronato, medidas con el ensayo Tandem Ostase, son significativamente diferentes desde la línea de base ($p \leq 0,0001$) a los 3 meses y en todos los puntos de valoración posteriores (6, 12 y 24 meses). Por el contrario, en el grupo placebo, las concentraciones de BAP disminuyeron en un 11% a los 3 y 6 meses y volvieron a los valores basales a los 24 meses.

En este estudio, los cambios en la BAP y los cambios en la DMO son coherentes con el conocimiento actual del remodelado óseo y del mecanismo de acción de las terapias antiosteoporóticas (24). Según estos resultados, se puede concluir que el descenso en las concentraciones de BAP medidas con el ensayo Tandem Ostase en los sujetos tratados con alendronato refleja cambios en el remodelado óseo que son el resultado de la terapia antiosteoporótica.

Para que tenga significación clínica, el porcentaje de cambio entre dos valores de marcador sérico debe rebasar tanto la variación biológica (intra-sujeto) del marcador como la variación analítica del ensayo (30). Este umbral es lo que se conoce como el porcentaje de cambio mínimo. Los porcentajes de cambio en un marcador que rebasan el porcentaje de cambio mínimo pueden atribuirse a un cambio en el estado clínico del sujeto, como por ejemplo la respuesta a la terapia (30). El porcentaje de cambio mínimo para un marcador bioquímico ha sido descrito por Soleiormos (30) y otros (31) mediante la fórmula:

$$\text{Porcentaje de cambio mínimo} = \sqrt{2 \times Z \times \sqrt{CV_p^2 + CV_a^2}}$$

siendo CV_p la variabilidad intra-sujeto, CV_a la imprecisión del ensayo, y Z la estadística Z , que depende de la probabilidad seleccionada para la significación y de si el cambio esperado es unidireccional ($Z_{\text{un}}=1,645$) o bidireccional ($Z = 1,96$).

La variabilidad intra-sujeto del ensayo Tandem Ostase se determinó a partir de muestras séricas procedentes de 17 mujeres posmenopáusicas sanas recogidas cada día durante un periodo de cinco días. El coeficiente de variación biológica promedio se calculó como 4,2%.

La variación analítica se basó en los datos de precisión intranalítica que figura en la sección "CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO" de este prospecto.

El porcentaje de cambio mínimo para la BAP medida por el ensayo Tandem Ostase se calculó como 25%. Por lo tanto, los cambios en las concentraciones de BAP en mujeres posmenopáusicas que exceden del 25% se pueden atribuir a cambios en el remodelado óseo.

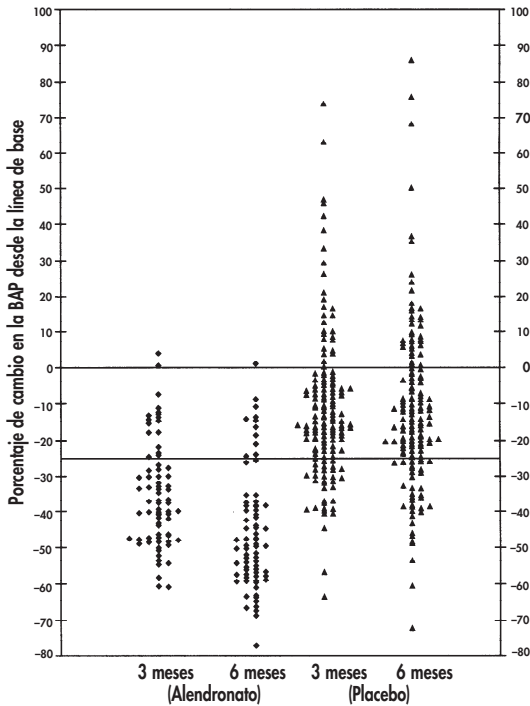
A continuación se presentan los porcentajes de cambio de BAP respecto de la línea de base en sujetos individuales. Se presentan datos tanto para los sujetos que recibieron placebo como para las que recibieron 10 mg de alendronato en los puntos de evaluación a los 3 y 6 meses. La línea horizontal en el punto cero representa la línea de base, y la línea horizontal en -25% representa el porcentaje de cambio mínimo para la BAP medida por el ensayo Tandem Ostase. En el grupo que recibió 10 mg de alendronato, el 77,0% (57/74) de las sujetas presentaba un descenso en la BAP desde la línea de base (tiempo 0) de un 25% o mayor a los 3 meses, y el 85,1% (63/74) de las sujetas presentaba un descenso en la BAP desde la línea de base de un 25% o mayor en el nadir (6 meses). A los 24 meses, el 90,3% (65/72) presentaba un descenso en la BAP del 25% o mayor. En el grupo placebo suplementado con calcio, el 75,7% (112/148) de las sujetas presentaba un descenso en la BAP desde la línea de base (tiempo 0) que era inferior al 25% (a los 6 meses). A los 24 meses, el 88,1% (126/143) del grupo placebo presentaba descensos en la BAP inferiores al 25%. Estos datos se resumen adicionalmente en la tabla que se incluye a continuación. Esta tabla muestra el número de sujetas en los grupos tratado y placebo (y el porcentaje de sujetas) que tenían descensos en BAP desde la línea de base $< 25\%$ ó $> 25\%$ (a los 3 y 6 meses, respectivamente).

Resumen de los porcentajes de cambio en BAP individuales desde la línea de base para sujetas que recibieron 10 mg de alendronato y placebo
Número de sujetas/Número total de sujetas

Porcentaje de cambio en BAP	3 Meses		6 Meses	
	Placebo N = 148	Alendronato 10 mg N = 74	Placebo N = 148	Alendronato 10 mg N = 74
Descenso del 25% o mayor	33/148 (22,3%)	57/74 (77,0%)	36/148 (24,3%)	63/74 (85,1%)
Descenso menor del 25%	115/148 (77,7%)	17/74 (23,0%)	112/148 (75,7%)	11/74 (14,9%)

En el grupo de 10 mg de alendronato, un descenso medio de BAP de 45,7% desde la línea de base hasta los 6 meses fue seguido de un aumento medio en la DMO de 7,8% a los 24 meses. A la inversa, el pequeño porcentaje de cambio desde la línea de base para la BAP a los 6 meses en el grupo placebo suplementado con calcio (-11,3%) estuvo acompañado por un ligero descenso en la DMO en -0,8% a los 24 meses.

Porcentaje de cambio en la BAP desde la línea de base
Sujetos en los grupos 10 mg de alendronato y placebo



En resumen, se ha demostrado que:

1. Las concentraciones de BAP reflejan el aumento en el remodelado óseo asociado con la deficiencia estrogénica en mujeres posmenopáusicas aparentemente sanas.
2. Las concentraciones de BAP reflejan cambios en el remodelado óseo que se producen como consecuencia de la terapia antiosteoporótica con alendronato en mujeres posmenopáusicas.
3. Los descensos clínicamente significativos en las concentraciones de BAP a los 3 y 6 meses son indicadores de cambios en el remodelado óseo. Una terapia efectiva con 10 mg de alendronato en mujeres posmenopáusicas osteoporóticas está indicada por incrementos en la DMO a los 24 meses.
4. Un descenso en la BAP del 25% o más desde la línea de base, medido por el ensayo Tandem Ostase, puede indicar cambios en el remodelado óseo que son consecuencia de la terapia antiosteoporótica.

En las sujetas que reciben terapia antiosteoporótica con alendronato y cuyos niveles de BAP no desciendan en un 25% desde la línea de base en los primeros puntos de valoración se deben hacer nuevas pruebas en los últimos puntos de valoración. De las 11 sujetas que demostraron un descenso inferior al 25% en la BAP entre la línea de base y los 6 meses, 9 de ellas finalmente mostrando descensos superiores a 25% en la BAP entre la línea de base y los 24 meses. Todas estas sujetas respondieron a 10 mg de alendronato según se determinó por los aumentos en la DMO. Las sujetas tratadas cuyos niveles de BAP no disminuyen en un 25% desde la línea de base deben ser evaluadas por otros medios clínicos para determinar la eficacia del tratamiento.

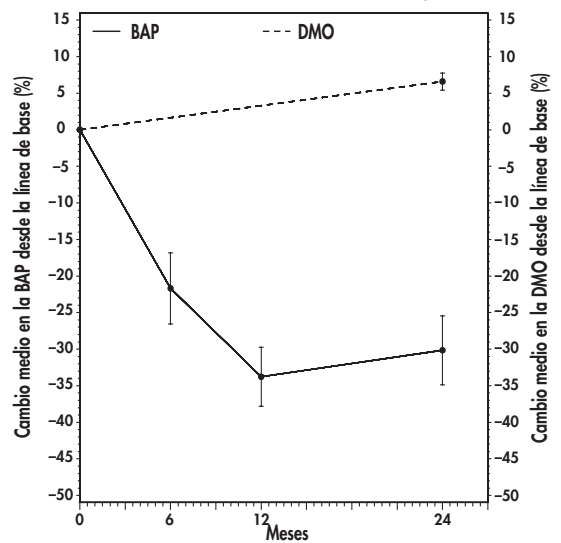
Mujeres posmenopáusicas – Terapia hormonal sustitutiva (THS)

Además del estudio con bifosfonato antes descrito, se iniciaron otros estudios con el fin de demostrar la capacidad del ensayo Tandem Ostase para reflejar alteraciones en el remodelado óseo en respuesta a la terapia estrogénica (29,32). A continuación se presentan los datos procedentes de uno de los estudios. En este estudio, mujeres posmenopáusicas sanas y no histerectomizadas (n = 12), con edades comprendidas entre 65 y 75 años, recibieron terapia diaria con estrógenos/progestina (0,625 mg de Premarin y 2,5 mg de Provera) durante dos años. Además, 6 mujeres sanas histerectomizadas recibieron estrógenos solos. La población total del estudio fue de 18 sujetas.

Utilizando el ensayo Tandem Ostase, se midió la ALP específica de los huesos en la línea de base y a los 6, 12 y 24 meses. La DMO en la columna lumbar se evaluó en la línea de base y a los 24 meses.

En la figura que se presenta a continuación, el porcentaje de cambio medio desde la línea de base y las barras de error estándar para BAP (eje de ordenadas izquierdo) y para DMO (eje de ordenadas derecho) se pasaron a una gráfica en cada punto de valoración. En las sujetas tratadas con estrógenos, se observa un aumento del 6,6% en la DMO en la columna lumbar respecto de la línea de base, lo que indica que la terapia estrogénica causó un efecto positivo en el hueso. Los datos que se presentan en la figura también muestran un descenso dependiente del tiempo en las concentraciones de BAP en el grupo tratado, que alcanzan un nadir a los 12 meses. Los descensos observados en las concentraciones de BAP en el grupo tratado con estrógenos, medidas por el ensayo Tandem Ostase, son significativamente diferentes de los valores de la línea de base ($p \leq 0,0001$) a los 6 meses y en todos los puntos de valoración posteriores (12 y 24 meses).

Datos del grupo tratado con estrógenos
Porcentaje de cambio medio desde la línea de base (± 1 DE) en BAP (Ostase) y DMO en la columna lumbar frente al tiempo



Los cambios en la BAP y los cambios en la DMO en este estudio son coherentes con los conocimientos actuales del remodelado óseo y del mecanismo de acción de las terapias antiosteoporóticas (5,33). Según estos resultados, se puede concluir que el descenso en las concentraciones de BAP medidas por el ensayo Tandem Ostase en las sujetas tratadas con estrógenos refleja cambios en el recambio óseo que son el resultado de la terapia antiosteoporótica.

Los resultados obtenidos con Tandem Ostase deberán utilizarse solamente con conjunción con información disponible de la evaluación clínica del paciente y de otros procedimientos diagnósticos.

CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO ESPECÍFICAS

Precisión intranálisis

La precisión intranálisis se determinó ensayando cuatro sueros control que contenían diferentes concentraciones de BAP. Cada suero control se ensayó en réplicas de 20. Los datos son los siguientes:

Suero control	1	2	3	4
Número de réplicas	20	20	20	20
Media de $\mu\text{g/L}$	7,4	27,3	52,7	79,5
Desviación estándar	0,48	0,78	1,35	3,54
% CV	6,5	2,9	2,6	4,5

Precisión entre análisis

La precisión entre análisis se determinó mediante medidas duplicadas de cuatro sueros control sobre una serie de 20 análisis calibrados individualmente:

Suero control	A	B	C	D
Número de ensayos	20	20	20	20
Media de $\mu\text{g/L}$	8,4	29,2	55,6	81,1
Desviación estándar	0,47	1,88	2,03	4,92
% CV	5,8	6,4	3,7	6,1

Recuperación y dilución

Se añadieron diferentes cantidades de una muestra de suero que contenía niveles elevados de BAP a sueros humanos que contenían BAP endógena y las muestras se ensayaron por triplicado.

Adición $\mu\text{g/L}$	Concentración esperada $\mu\text{g/L}$	Concentración obtenida $\mu\text{g/L}$	% Recuperación*
14,0	24,6	24,8	100,9
39,9	50,5	48,8	96,6
59,2	69,8	66,0	94,6
92,2	102,8	92,6	90,1

*El % de recuperación es igual a la concentración obtenida dividida por la concentración esperada multiplicado por cien.

Se diluyó una muestra de suero que contenía una concentración elevada de BAP con Calibrador Cero/diluyente y se ensayó por triplicado en diluciones múltiples.

Adición $\mu\text{g/L}$	Concentración esperada $\mu\text{g/L}$	Concentración obtenida $\mu\text{g/L}$	% Recuperación*
Neto	N/A	54,6	N/A
1:4	27,3	27,9	102,3
1:6	18,2	17,4	95,4
1:8	13,7	12,7	92,8

*El % de recuperación es igual a la concentración obtenida dividida por la concentración esperada multiplicado por cien.

Sustancias que causan interferencias

- La **hemoglobina**, ensayada a concentraciones de hasta 500 mg/dL, no interfiere con el ensayo Ostase BAP.
- La **bilirrubina conjugada y no conjugada**, ensayada a concentraciones de hasta 40 mg/dL y 20 mg/dL, respectivamente, no interfiere con el ensayo Ostase BAP.
- Los **triglicéridos**, ensayados a concentraciones de hasta 2000 mg/dL, no interfieren con el ensayo Ostase BAP.
- Las **proteínas totales**, ensayadas a concentraciones entre 3 y 14 g/dL, no interfieren con el ensayo Ostase BAP.
- 100 U/L de ALP intestinal da un resultado de 1,0 µg/L en el ensayo Ostase BAP.
- 100 U/L de ALP placentaria no produjo resultados detectables en el ensayo Ostase BAP.

Reactividad de la ALP hepática

La reactividad de la ALP hepática en el ensayo Ostase BAP se determinó utilizando muestras séricas de pacientes con enfermedad hepática y muestras séricas de pacientes con enfermedad de Paget. Las muestras se seleccionaron por electroforesis, demostrándose que contenían > 95% de ALP hepáticas o de BAP.

Para evaluar la actividad de la ALP hepática, se utilizaron dos métodos. El primer procedimiento, descrito por Moss y Whitby (35), utilizó un método de inactivación por calor que minimiza la contribución de la BAP endógena en las muestras con ALP hepática elevada. Utilizando este método, la actividad de 100 U/L de ALP hepática produjeron un resultado de 2,8 a 3,4 µg/L en el ensayo Ostase BAP.

El segundo procedimiento, descrito por Price y cols. (36), utilizó el método de la pendiente (ensayo Ostase BAP frente a ALP total), donde no se utilizó pretratamiento de las muestras. En este estudio, la cuantificación mediante Ostase BAP de las muestras de ALP hepática y BAP (eje de ordenadas) se pasó a un gráfico frente a la actividad de ALP total (eje de abscisas) en cada muestra. A partir de los valores de las muestras de ALP hepática y BAP se determinó que:

- 100 U/L de actividad de ALP hepática produjeron un resultado de 6,2 µg/L en el ensayo Ostase BAP;
- y
- 100 U/L de actividad de BAP produjeron un resultado de 36,9 µg/L en el ensayo Ostase BAP.

Interferencias farmacológicas

Se añadieron diferentes concentraciones de fármacos a tres sueros control independientes que contenían BAP y se ensayaron por cuatuplicado. A continuación se enumeran los fármacos y las concentraciones más altas analizadas. La prueba se basó en la Directriz EP-7P del NCCLS (Pruebas de interferencia en pruebas clínicas).

acetaminofeno (paracetamol)	20 mg/dL
alendronato	5 mg/dL
aspirina	50 mg/dL
calcitonina de salmón	112 UI/dL
calcio	20 mg/dL
estrógeno	400 ng/dL
etidronato	105 mg/dL
ibuprofeno	40 mg/dL
pamidronato	18 mg/dL
progesterona	25 mg/dL
vitamina D	80.500 UI/dL

Estos fármacos no interfirieron con la recuperación de BAP de los sueros control en el ensayo Ostase BAP.

Concentración mínima detectable

Se estima que la concentración mínima detectable de BAP en el ensayo Ostase BAP es de 0,7 µg de BAP/L. La concentración mínima detectable se define como la concentración de BAP que se corresponde con la absorbancia que es dos desviaciones estándar mayor que la absorbancia media de 20 determinaciones réplicas del Calibrador Cero/diluyente.

La compra de este kit permite su utilización según las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.376.110 y 4.486.530.

Tandem® y Ostase® son marcas registradas de Hybritech Incorporated, una subsidiaria de Beckman Coulter, Inc.

*Tween es una marca comercial de ICI Americas, Inc.

Ostase[®] BAP

Immunoenzymetrischer Assay



Für die quantitative Bestimmung von knochenspezifischer alkalischer Phosphatase (BAP) in Humanserum

VERWENDUNGSZWECK

Der immunoenzymetrische Assay Ostase BAP ist eine In-vitro-Vorrichtung und dient zur quantitativen Bestimmung von knochenspezifischer alkalischer Phosphatase (BAP) in Humanserum, einem Indikator der Osteoblastenaktivität. Dieser Test ist zur Behandlungsunterstützung bei postmenopausaler Osteoporose und Paget-Syndrom vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, bei dem sich Knochenaufbau und -abbau (auch Resorption genannt) durch das gesamte Leben hindurch als sogenannter Umbau fortsetzen. Der Umbauprozess ist eine Funktion von komplexen Wechselwirkungen zwischen zwei Typen von Knochenzellen: Osteoblasten für die Knochenbildung und Osteoklasten für die Knochenresorption (1-3). Knochenbildung und Knochenresorption sind voneinander abhängige Prozesse, die unter normalen Umständen eng miteinander verknüpft sind (2,4). Diese enge Verknüpfung ist grundlegend für die Aufrechterhaltung der biochemischen Kompetenz des Skeletts, wodurch die Organisation der Knochenstruktur, Form und Stärke aufrecht erhalten wird (2,3,5).

Man nimmt an, daß die BAP-Serumspiegel den metabolischen Status der Osteoblasten reflektieren (6,7). Eine genaue Einschätzung des Knochenmetabolismus ist unerlässlich für die Bestimmung der Schwere metabolischer Knochenkrankungen sowie des Ansprechens einer Therapie. Die Bestimmung der BAP-Serumspiegel hat sich als nützlich bei der Bewertung von Patienten mit Paget-Syndrom, Osteomalazie, primärem Hyperparathyreoidismus, renaler Osteodystrophie, Osteoporose und Skelett-Metastasen erwiesen (6-10). Die anerkannte Methode für die Diagnose und Überwachung von Patienten mit Paget-Syndrom ist die Bestimmung der Gesamt-ALP-Werte.

Paget-Syndrom ist eine verbreitete Erkrankung des Skeletts, bei der es zu einer fokalen Proliferation der normalen zellulären Komponenten des Knochens kommt. Die Erkrankung zeigt eine höhere Prävalenz als ursprünglich angenommen, mit einer populationspezifischen Inzidenz von 3-4 % bei Patienten mittleren Alters und 10-15 % bei älteren Patienten (11). Bei jüngeren Menschen tritt die Erkrankung nicht auf. Die Mehrheit der Patienten mit Paget-Syndrom zeigen keine Symptome, und die Erkrankung wird oft erst dann diagnostiziert, wenn während einer medizinischen Untersuchung, die ursächlich nicht mit dieser Erkrankung zusammenhängt, auffällige Röntgenbefunde oder ALP-Serumwerte gefunden werden. Bei symptomatischen Patienten sind Schmerzen und Deformationen die häufigsten Beschwerden.

Das Risiko von Osteoporose, einer weiteren Störung des Knochenumbaus, hängt teilweise von der Skelettentwicklung ab, dem Erreichen der maximalen Knochenmasse und, später im Leben, der Menge der verlorenen Knochenmasse. Bei gesunden Kindern ist der Knochenaufbau gegenüber der Knochenresorption begünstigt, so daß eine Knochenbildung und normales Skelettwachstum erfolgt (3). Bei gesunden jungen Erwachsenen sind der Knochenaufbau und der Knochenabbau ausgewogen, so daß weder eine Nettozunahme noch -abnahme der Skelettmasse erfolgt. Mit fortschreitendem Alter erleben Männer und Frauen ein Ungleichgewicht beim Knochenumbau, bei dem der Abbau den Aufbau leicht überwiegt, so daß mit der Zeit ein kontinuierlicher Nettoverlust an Knochenmasse erfolgt (1,2,4,12). Bleibt dieses Ungleichgewicht bestehen, so verringert sich die Knochenmasse dermaßen, daß das Skelett den normalen mechanischen Belastungen nicht mehr ausreichend standhält und es abnorm bruchanfällig wird. Dieser übermäßige Verlust an Knochenmasse mit zunehmender Bruchanfälligkeit ist eine als Osteoporose bekannte Störung (5).

Die verbreitetste Form der Osteoporose tritt infolge von Östrogenmangel bei postmenopausalen Frauen auf (2,12,13). Ein rapider Knochenverlust tritt als Begleiterscheinung des sinkenden Östrogenpiegels bei Beginn der Menopause oder auch nach der chirurgischen Entfernung der Ovarien auf. Der rapide Knochenverlust resultiert aus dem Ungleichgewicht zwischen Knochenumbau und Zunahme des Knochenumsatzes (5,14-16). In den Vereinigten Staaten leiden ca. 25 Millionen postmenopausale Frauen an Osteoporose. Osteoporose ist die Ursache für ca. 1,5 Millionen Knochenbrüche pro Jahr, darunter ca. 500.000 Wirbelbrüche, 250.000 Hüftbrüche und 200.000 Brüche der distalen Speiche (Radius) (2,5,17).

Die Hormonersatztherapie ist zur Zeit die am häufigsten verschriebene Therapie zur Vorbeugung osteoporotischer Brüche für postmenopausale Frauen (4,5,18-20). Viele Frauen können oder wollen jedoch die Hormontherapie aufgrund des erhöhten Risikopotentials für Krebs und aufgrund des Wiedereinsatzes der Regelblutung nicht nutzen. Aufgrund dessen wurden andere Verbindungen für die Osteoporose-Behandlung entwickelt, wie zum Beispiel Bisphosphonate, die eine Standardbehandlung für das Paget-Syndrom der Knochen darstellen. Die antiresorptiven Eigenschaften von Bisphosphonaten führen zu einer Minderung des Knochenumbaus und folglich zu einer Minderung des allgemeinen Knochenverlusts.

Zur Überwachung metabolischer Knochenkrankheiten nutzt man biochemische Marker. Zur Überwachung des Paget-Syndroms wird Urin-Hydroxyprolin und Gesamt-Serum-ALP genutzt. Osteoporose stellt jedoch eine subtilere Veränderung des Knochenumbauprozesses dar; daher werden spezifischere und empfindlichere Marker benötigt.

Der Assay Ostase BAP ist ein In-vitro-Test zur quantitativen BAP-Bestimmung in Humanserum. Die Überwachung von Veränderungen des BAP-Spiegels hat sich bei Patienten als nützlich erwiesen, die im Hinblick auf metabolische Knochenkrankungen behandelt werden (6,7,10,21,22).

TESTPRINZIP

Der Assay Ostase BAP ist ein immunoenzymetrischer Festphasen-Assay mit monoklonalen Antikörpern. BAP-haltige Proben reagieren mit einer Lösung, die mit Biotin markierte, für BAP spezifische monoklonale Antikörper enthält. Die Reaktion erfolgt in einem Kunststoffrahmen mit Streifen (Festphase), deren Vertiefungen mit Streptavidin beschichtet sind. Nach der Bildung eines Komplexes aus Festphase, Erfassungantikörper und BAP wird die Mikrotiterplatte gewaschen, um ungebundenes BAP zu entfernen

und anschließend mit einem Enzymsubstrat inkubiert. Der Umfang der Substratumwandlung wird in einem Mikrotiterplatten-Leser durch Messung der Extinktion der gestoppten Reaktion bei 405 nm kolorimetrisch bestimmt. Die Extinktion ist dem BAP-Spiegel der Testprobe proportional. Die Berechnung des BAP-Spiegels in der Probe erfolgt durch gleichzeitiges Messen von BAP-Kalibratoren und Null-Kalibrator/Verdünner.

PRODUKTINFORMATIONEN

Kitbestandteile	Bestell-Nr. AC-20F1 96 Tests
Konjugat [CONJ] Anti-BAP (monoklonales Maus-IgG) mit Biotin in einer Rind-Pferd Protein-Matrix mit 0,09 % Natriumazid.	1 x 14 mL
Mikroplatten [MICROPLAT] Mit Streptavidin beschichtete Vertiefungen in Kunststoff-Mikrotiterstreifen in Kunststoffrahmen. Trockenmittel: Silica-gel.	1 x 96 Wells
Null-Kalibrator/Verdünner (0) [CAL 0] Protein-Matrix (Rind) ohne meßbaren Anteil von BAP (0 µg ALP/L) mit 0,09 % Natriumazid.	1 x 14 mL
Kalibratoren (1-5) [CAL 1] - [5] Protein-Matrix (Rind) mit ca. 7, 15, 30, 60 und 90 µg Human-BAP/L und 0,09 % Natriumazid. Sollwerte enthält die Kalibratorkarte	5 x 1 mL
Niedrige Kontrolle (1) [CTRL 1] Protein-Matrix (Rind) mit ca. 11 µg Human-BAP/L und 0,09 % Natriumazid. Konzentrationsbereiche, siehe Qualitätskontrollbericht.	1 x 1 mL
Hohe Kontrolle (2) [CTRL 2] Protein-Matrix (Rind) mit ca. 45 µg Human-BAP/L und 0,09 % Natriumazid. Konzentrationsbereiche, siehe Qualitätskontrollbericht .	1 x 1 mL
Waschkonzentrat [WASHBUF 20X] Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween.	1 x 50 mL
Substratkonzentrat [SUBS]pNPP p-Nitrophenyl-phosphat in Stabilisierungspuffer mit Konservierungsmittel.	1 x 20 mL
Stopreagenz [NaOH] 1 N Natriumhydroxide.	1 x 14 mL
Qualitätskontrollbericht, Gebrauchsinformation	je 1

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. **In-vitro-Diagnostikum.**
2. **Niemals mit dem Mund pipettieren.**
3. **Im festgelegten Arbeitsbereich nicht essen, trinken oder rauchen.**
4. **Nach der Handhabung der Proben und Kitbestandteile Hände gründlich waschen.**
5. Einige der Bestandteile dieses Kits enthalten Material humanen Ursprungs. Dieses Material wurde mit negativem Ergebnis auf das Vorhandensein von Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Antikörpern gegen Hepatitis-C-Virus (HCV) und Antikörpern gegen die Humantumdefizienzviren (HIV-1 und HIV-2) untersucht. Weil jedoch nie völlig ausgeschlossen werden kann, daß infektiöse Erreger vorhanden sind – keine heute bekannte Testmethode kann dies mit letzter Sicherheit gewährleisten – **sollten alle Reagenzien und Patientenproben als potentiell infektiös angesehen und mit entsprechender Sorgfalt gehandhabt werden** (23).
6. Natriumazid kann mit Blei und Kupfer in Leitungen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Um eine Bildung solcher Metallazide zu vermeiden, nach dem Ausgießen mit reichlich Wasser nachspülen (24).
7. Das Stopreagenz dieses Kits enthält 1 N NaOH, einer korrosiven Substanz, die Verätzungen hervorruft. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Nicht einnehmen oder einatmen. Bei Laborarbeiten Schutzbrille, Schutzhandschuhe und Laborkittel tragen.
8. **Die Reagenzien-Aliquote müssen so aus den Fläschchen entnommen werden, daß eine mikrobielle Kontamination vermieden wird.**

LAGERUNG UND STABILITÄT

- Die Ostase BAP-Reagenzien sind bei 2–8 °C zu lagern und in diesem Falle bis zu dem auf dem Kit-Etikett aufgedruckten Verfallsdatum stabil.
- Die Waschlösung und das Stopreagenz sind bei 2–30 °C bis zu dem auf dem Flaschen-Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.
- Alle Reagenzien vor Gebrauch Zimmertemperatur (18–25 °C) erreichen lassen. Nach Gebrauch sind alle Reagenzien (mit Ausnahme der Waschlösung) bei 2–8 °C zu lagern.
- Die Wiederfindungswerte der Kit-Kontrollen sollten innerhalb der angegebenen Bereiche liegen.
- Unbenutzte Vertiefungsstreifen sollten wieder in die Kunststoffverpackung gegeben und zusammen mit dem beiliegenden Trockenmittel-Beutel bei 2–8 °C aufbewahrt werden.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums dürfen die Kitbestandteile nicht mehr benutzt werden.

GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DER PROBEN

- Es ist keine spezielle Patientenvorbereitung erforderlich.
- Mit geeigneter medizinischer Technik eine Vollblutprobe entnehmen.
- Das Blut gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugieren abcheiden.
- Die Proben so sammeln, daß Hämolyse vermieden wird.
- Für den Assay Ostase BAP ist Serum erforderlich. Die Leistung bei Verwendung von Plasmaproben wurde nicht ermittelt.
- Erfolgt die Bestimmung der Serumproben innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach der Entnahme, die Proben bei 2–8 °C im Kühlschrank lagern.
- Proben, die länger gelagert werden müssen (bis zu 2 Monate lang), sind bei –70 °C einzufrieren.
- Trübe Serumproben oder Proben mit Partikelgehalt sind vor der Analyse zu zentrifugieren.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE ARTIKEL

- Präzisionspipetten mit Einmal-Spitzen (festgelegtes oder regulierbares Volumen) für 50, 100 und 150 µL (± 1 %). Wahlweise kann eine Mehrkanal-Präzisionspipette zusammen mit einem Einweg-Trichter für die Zugabe des Anti-BAP-Assay-Konjugats, Substrates und Stopreagenzes verwendet werden.
- Einmal-Pipettenspitzen für 50, 100 und 150 µL
- Teströhrchen für die Probenverdünnung
- Mikrotiterplatten-Waschvorrichtung
- Absaugvorrichtung
- Destilliertes Wasser
- Zeitgeber
- Behälter zur Aufbewahrung der Waschlösung
- Mikrotiterplatten-Leser (Primärwellenlänge: 405 nm; Hintergrundsubtraktion: 600–650 nm) sowie Software zur Datenreduzierung
- Flachbett-Rotationsmischer für Mikrotiterplatten (Bereich: 500 bis 900 U/Min)

Informationen über vollständige Reagenzienhandlungssysteme, Datenreduzierungssysteme und Vorrichtungen zur Flüssigkeitshandhabung erhalten Sie über die zuständige Vertretung von Beckman Coulter.

REAGENZENVORBEREITUNG

- Alle Reagenzien vor Gebrauch Zimmertemperatur (18–25 °C) erreichen lassen.
- Die Reagenzien vor jedem Gebrauch durch behutsames Schütteln oder Schwenken gründlich mischen.
- Für alle Proben, Kalibratoren und Kontrollen jeweils eine saubere Pipettenspitze verwenden, um Kontamination zu vermeiden.
- Waschlösung: Zur Herstellung der Waschlösung Waschkonzentrat in 950 mL destilliertes Wasser geben und mischen.

TESTDURCHFÜHRUNG

- Das Verfahren für den Assay Ostase BAP erfolgt bei Zimmertemperatur. Sämtliche Serumproben und Kitbestandteile vor Gebrauch Zimmertemperatur (18–25 °C) erreichen lassen und gründlich mischen.
- Null-Kalibrator/Verdünner, Kalibratoren und Kontrollen sind im gleichen Plattenrahmen als Doppelbestimmung zu testen.
- Da beim Stoppen jeder Inkubation eine laufende Reaktion abgebrochen wird (d.h. eine Antikörperbindung oder eine Substratumwandlung), ist es für die zuverlässige Assay-Kalibrierung erforderlich, daß die Inkubationszeiten für sämtliche Vertiefungen gleich sind.

Zur Testdurchführung folgendermaßen vorgehen:

1. Die Teststreifen mit den Vertiefungen sowie die Rahmen entsprechend beschriften und die Streifen im Rahmen plazieren. Pro Assay je 6 Kalibratoren, niedrige und hohe Kontrollen analysieren.
2. Jeweils 50 µL Null-Kalibrator, Kalibratoren (B–F), Kontrollen und Patientenprobe auf den Boden jeder entsprechend beschrifteten Vertiefung pipettieren.
3. In jede Vertiefung 100 µL Konjugat pipettieren.
4. 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur (18–25 °C) auf einem Flachbett-Rotationsmischer (Einstellung: 500 bis 900 U/min) inkubieren.
5. Die Mikrotiterplatten-Vertiefungen 3mal wie folgt waschen:
 - a) Die Flüssigkeit aus dem ersten Streifen absaugen.
 - b) In den ersten Streifen 300 µL Waschlösung pipettieren.
 - c) Die Schritte a und b für alle weiteren Streifen wiederholen.
 - d) Die Schritte a und c zweimal wiederholen.
6. In jede Vertiefung 150 µL Substratreagenz pipettieren. Unverzüglich mit dem nächsten Schritt fortfahren.
7. 13 bis 15 Minuten lang bei 18–25 °C auf einem Flachbett-Rotationsmischer (Einstellung: 500 bis 900 U/min) inkubieren. Unverzüglich mit dem nächsten Schritt fortfahren.
8. In jede Vertiefung 100 µL Stopreagenz geben.
9. Die Extinktion jeder Vertiefung bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Leser messen. Dabei für jede Vertiefung einen Leerwert (bei 600–650 nm) abziehen. Die Platte ist innerhalb von 1 Stunde nach dem Stoppen der Reaktion abzulesen.
10. Die Ergebnisse berechnen, wie unter "Gerätschaften und Ergebnisberechnung" beschrieben.

VERFAHRENSANMERKUNGEN

1. **Hinweis zur Plattenwäsche:** Bei immunoenzymatischen Assays ist zum Entfernen des ungebundenen biotin-markierten Antikörpers eine wirksame Wäsche erforderlich. Für die einwandfreie Ergebnismessung ist daher die gründliche Wäsche aller Vertiefungen sowie das Entfernen der letzten Waschlösungströpfchen äußerst wichtig.
2. Proben, deren BAP-Spiegel über dem des höchsten Kalibrators liegen, sind mit dem Null-Kalibrator/Verdünner zu verdünnen und gemäß der Anweisungen zur **Testdurchführung** zu bestimmen. Der Verdünnungsfaktor ist bei der Ergebnisberechnung zu berücksichtigen. Alle verdünnten Proben sind vor Testbeginn gründlich zu mischen. Die empfohlenen Verdünnungsverhältnisse für Proben, deren BAP-Spiegel über dem des höchsten Kalibrators liegen, sind 1:3, 1:5 oder 1:10. Serumproben, deren BAP-Spiegel über dem des höchsten Kalibrators liegen, sollten jedoch so verdünnt werden, daß der Meßwert der verdünnten Probe mehr als 10 µg BAP/L beträgt.
3. Da die Extinktion eine Funktion von Temperatur und Dauer der Inkubation mit dem Substratreagenz ist, ist es äußerst wichtig, daß die Inkubationsbedingungen für alle Vertiefungen/Platten die gleichen sind. Dies wird dadurch erreicht, daß die Dauer der Reagenzienpipettierung von Anfang bis Ende (ohne Unterbrechungen) sowohl bei der Substratzugabe als auch bei der Stopreagenz-zugabe exakt die gleiche ist. Die Zugabe dieser Reagenzien sollte nicht länger als 90 Sekunden und die gesamte Substratinkubation nicht mehr als 15 Minuten dauern.
4. Zwecks Arbeitserleichterung können Automatik- oder Mehrkanal-Pipettoren zum Pipettieren von Konjugat, Waschlösung, Substrat und Stopreagenz benutzt werden. Zum Pipettieren der Kalibratoren, Kontrollen und Proben sollten Pipetten mit Einmal-Spitzen benutzt und die Spitzen nach jeder Probenpipettierung gewechselt werden, um potentielle Probenverschleppung und die Kontaminierung von Reagenzien oder Proben auszuschließen.
5. Die Bestandteile verschiedener Kit-Chargen nicht gemeinsam verwenden.

GERÄTSCHAFTEN UND ERGEBNISBERECHNUNG

Die Ergebnisse können mit rechnerunterstützten Methoden oder manuell auf Millimeterpapier berechnet werden.

Computerauswertung

Die Punkt-zu-Punkt-Kurvenanpassungsmethode wird empfohlen. Die Punkt-zu-Punkt-Software erstellt eine gerade Linie zwischen den Mittelwerten der Kalibrator-Replikate – einschließlich des 0-µg-BAP/L-Kalibrators – und erbringt mit den beschriebenen Verfahren und Kalibrationsmethoden gute Resultate. Weitere Informationen zur rechnerunterstützten Datenreduzierung erhalten Sie über die zuständige Vertretung von Beckman Coulter, Inc.

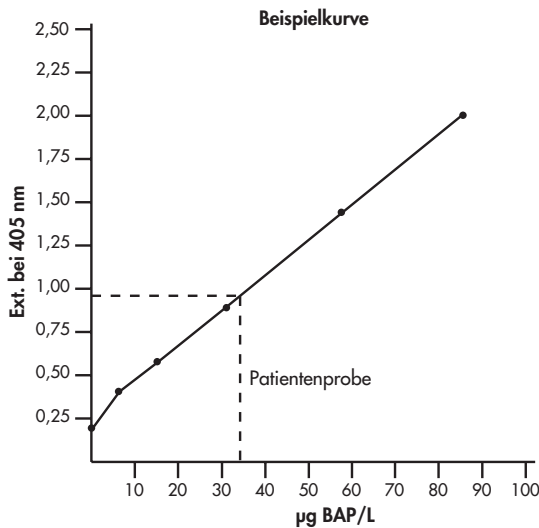
Manuelle Auswertung

Die Ostase BAP-Bezugskurve kann manuell auf Millimeterpapier erstellt werden, indem auf der Y-Achse die durchschnittliche Extinktion jedes Kalibrators und auf der X-Achse die BAP-Konzentration des Kalibrators aufgetragen werden. Die Kalibratorpunkte werden durch eine Punkt-zu-Punkt-Kurve verbunden, wobei die resultierende Kurve nicht unbedingt geradlinig sein muß.

Zur Bestimmung der BAP-Konzentration der Kontrollen und Patientenproben wird ab dem Extinktionswert der Testprobe eine horizontale Linie zur Bezugskurve gezogen. Am Schnittpunkt dieser Horizontalen und der Kurve wird dann eine senkrechte Linie hinunter zur X-Achse gezogen und dort die BAP-Konzentration abgelesen.

Liegt die Extinktion eines Probenreplikats über der des höchsten Kalibrators, ist die Probe zu verdünnen und erneut zu analysieren. Die Konzentrationswiederfindung der verdünnten Probe ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Beispieldaten				
Vertiefung Nr.	Beschreibung	Ext. bei 405 nm	Mittl. Ext.	BAP µg/L
1	Kalibrator (0)	0,193		
2		0,187	0,190	0,0
3	Kalibrator (1)	0,401		
4		0,402	0,402	7,2
5	Kalibrator (2)	0,595		
6		0,572	0,584	15,5
7	Kalibrator (3)	0,908		
8		0,866	0,887	31,9
9	Kalibrator (4)	1,499		
10		1,460	1,479	58,4
11	Kalibrator (5)	2,000		
12		2,051	2,026	85,8
13	Patientenprobe	0,911		33,0



QUALITÄTSKONTROLLE UND KRITERIEN FÜR AKZEPTABLE ERGEBNISSE

Zur Guten Laborpraxis gehört die Bestimmung von Kontrollproben innerhalb des Testansatzes, um die einwandfreie Leistung aller Reagenzien und Protokolle zu gewährleisten. Der Antikörper-Kit Ostase BAP enthält Kontrollen zur Verifizierung der Assay-Leistung.

1. Die Wiederfindungswerte der Kontrollen müssen innerhalb der angegebenen Bereiche liegen.
2. Der Variationskoeffizient (% VK) der bei 405 nm erhaltenen Extinktionsmeßwerte aller Kalibratoren und Kontrollproben sollte weniger als 10 % betragen.

GRENZEN DES VERFAHRENS

HAMA-Interferenz: Einige Patienten weisen Antikörper gegen Mausproteine (HAMA) auf, die Immunoassays mit aus Mäusen gewonnenen Antikörpern stören können. Insbesondere zeigte sich bei Serumproben von Patienten, die sich Therapien oder diagnostischen Maßnahmen mit Infusion von monoklonalen Maus-Antikörpern unterzogen hatten, daß diese Assays falsche Ergebnisse erbringen können. Daher sollten die Ostase BAP-Ergebnisse solcher Patienten ausschließlich in Verbindung mit Resultaten anderer diagnostischer Maßnahmen und der klinischen Beurteilung des Patienten verwendet werden.

Die Immunreaktivität von Leber-ALP wurde für den Assay Ostase BAP bestimmt: 100 E/L Leber-ALP-Aktivität ergeben beim Assay Ostase BAP Resultate zwischen 2,8 und 6,2 µg/L. Serumproben mit erheblich erhöhter Leber-ALP-Aktivität können beim Assay Ostase BAP zu erhöhten Ergebnissen führen. Patienten mit metabolischen Knochenkrankheiten, die eine geringe Krankheitsaktivität aufweisen, können BAP-Spiegel aufweisen, die im Normalbereich des Assays Ostase BAP liegen.

Die Ergebnisse des Assays Ostase BAP sollten nur in Verbindung mit Informationen verwendet werden, die aus der klinischen Bewertung des Patienten bzw. der Patientin und anderen Diagnoseverfahren zur Verfügung stehen. Der Assay Ostase BAP wird daher nicht zur Verwendung als Screening-Verfahren für das Vorkommen von Osteoporose in der Allgemeinbevölkerung empfohlen. Darüber hinaus kann der Assay Ostase BAP nicht zur Einschätzung der Geschwindigkeit der Knochenbildung oder des Knochenbaus verwendet werden.

ERWARTETE WERTE

Die in den Abschnitten "Erwartete Werte" und "Klinische Studien" angeführten BAP-Ergebnisse wurden unter Verwendung des Assays Tandem-R Ostase ermittelt. Eine Korrelationsstudie der Assays Ostase BAP und Tandem-R Ostase zeigte jedoch eine gute Übereinstimmung der Assays ($y = 1,02x + 0,28$, $r = 0,9700$, $n = 136$).

Der Assay Tandem-R Ostase wurde in Studien an 6 verschiedenen Testorten mit offensichtlich gesunden Erwachsenen (im Alter von 20 bis 89 Jahren) durchgeführt. Der mittlere BAP-Spiegel, die Standardabweichung (S), der Medianwert, und das 95er-Perzentil für Männer (N = 217), Frauen vor der Menopause (N=228) und Frauen nach der Menopause (N = 529) sind in der folgenden Tabelle angegeben:

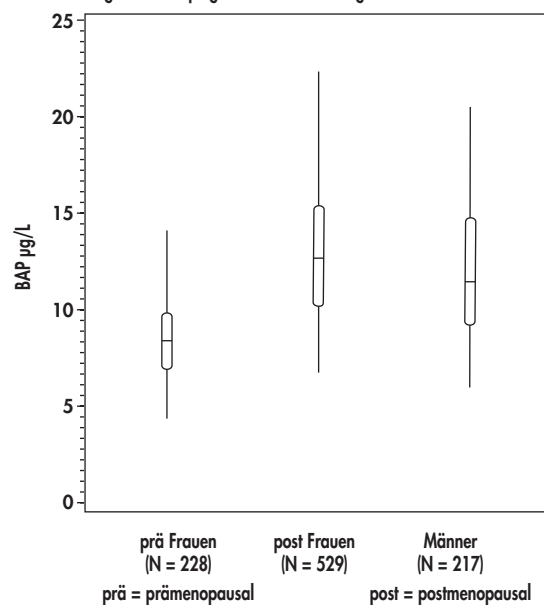
Zusammenfassung der BAP-Spiegel bei offensichtlich gesunden Erwachsenen*

	N	BAP-Mittelwert µg/L	S	BAP-Medianwert µg/L	95er-BAP-95 Perzentil µg/L
Männer	217	12,3	4,3	11,6	20,1
Prämenopausale Frauen	228	8,7	2,9	8,5	14,3
Postmenopausale Frauen	529	13,2	4,7	12,5	22,4

* Mit dem immunoradiometrischen Assay Tandem-R Ostase erhaltenen Ergebnisse

Die obigen Ergebnisse zeigen, daß die mittleren BAP-Spiegel bei einer Population postmenopausaler Frauen höher liegen, als die mittleren BAP-Spiegel bei prämenopausalen Frauen ($p \leq 0,0001$). Diese Zunahme der mittleren BAP-Spiegel reflektiert die durch Östrogenmangel bedingte Zunahme des Knochenbaus der postmenopausalen Population im Vergleich zur prämenopausalen Population (2,8,12,13). Es gibt jedoch eine beträchtliche Überschneidung der BAP-Spiegel der in der nachfolgenden Verteilungskurve dargestellten Populationen:

Verteilung der BAP-Spiegel bei offensichtlich gesunden Erwachsenen*



* Mit dem immunoradiometrischen Assay Tandem-R Ostase erhaltenen Ergebnisse.

Für jede der im Diagramm dargestellten Populationen gilt folgendes: 1) Die waagerechten Linien in jedem Kästchen stellen die Median-Spiegel dar. 2) Die oberen und unteren Ränder jedes Kästchens stellen Zwischenquartilbereiche dar, das heißt der obere Rand begrenzt 25 % der Werte über dem Median, während der untere Rand 25 % der Werte unter dem Median begrenzt. 3) Das untere Ende der senkrechten Linien repräsentiert den Spiegel des 5er-Perzentils, während das obere Ende das 95er-Perzentil darstellt.

Die oben aufgelisteten Beobachtungsbereiche sind nur für diese Studie repräsentativ und geben nicht unbedingt die Bereiche wieder, die in anderen klinischen Labors beobachtet werden. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich (Normalbereich) festlegen.

KLINISCHE STUDIEN

Paget-Syndrom

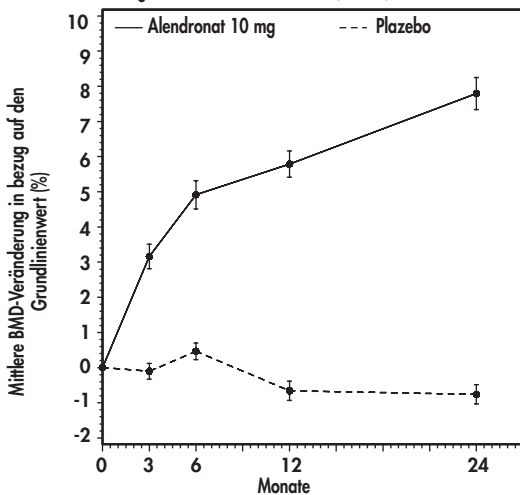
In Korrelationsstudien wurden die mit dem Assay Tandem-R Ostase erhaltenen BAP-Serumspiegel mit den Ergebnissen von zwei gegenwärtig auf dem Markt erhältlichen elektrophoretischen Methoden und zwei Enzymaktivitäts-Assays auf Gesamt-ALP verglichen. Diese Studien wurden in klinischen Forschungseinrichtungen unter Verwendung von 100 Proben von Patienten mit Paget-Syndrom durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient (r) zwischen dem Assay Tandem-R Ostase und den elektrophoretischen Methoden beträgt 0,9418. Der Korrelationskoeffizient (r) zwischen dem Assay Tandem-R Ostase und den Enzymaktivitäts-Assays für Gesamt-ALP beträgt 0,9459.

Postmenopausale Osteoporose – Behandlung mit Bisphosphonat

Um die Eignung des Assays Tandem-R Ostase zur Wiedergabe von Änderungen im Knochenumbau als Reaktion auf die Therapie für postmenopausale Osteoporose zu testen, wurde eine Studie an Patientinnen mit klinisch definierter Osteoporose durchgeführt. Die Patientinnen wurden mit einem Bisphosphonat behandelt (Natrium-Alendronat). Die Studie erfolgte an mehreren Standorten, prospektiv, doppelt blind und plazebokontrolliert (25). Die vorliegenden Daten stammen von Probanden, die (per Zufallsverteilung) entweder Plazebopräparate (N = 148) oder 10 mg Alendronat (N = 74) erhielten. Alle Probanden nahmen täglich zusätzlich 500 mg Kalzium ein. Anhand von DXA-Röntgenaufnahmen der Lendenwirbelsäule wurde eine BMD-Bestimmung (bone mineral density = Mineraleichte der Knochen) vorgenommen. Außerdem wurden unter Verwendung des Assays Tandem Ostase serielle BAP-Bestimmungen durchgeführt.

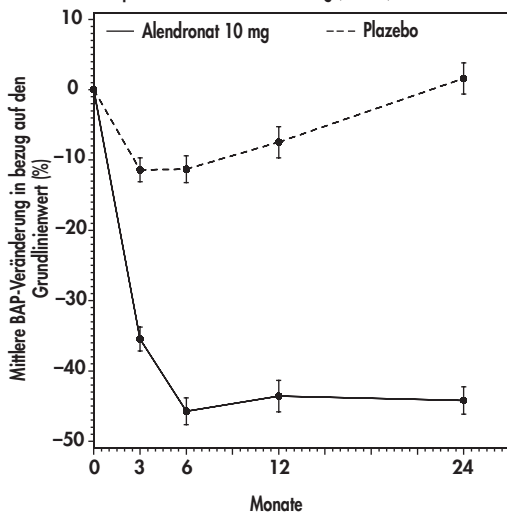
Die durchschnittlichen prozentualen Veränderungen in bezug auf den Grundlinienwert sowie die BMD-Standardfehlerlinien in den Plazebo- und tatsächlich mit Alendronat behandelten Gruppen sind in der nachfolgenden Abbildung im zeitlichen Verlauf dargestellt. Bei der Alendronat-Gruppe zeigte sich nach 24 Monaten eine 7,8-%ige BMD-Zunahme gegenüber dem Grundlinienwert, was darauf hinweist, daß die Bisphosphonatherapie eine positive Wirkung auf die Knochen hatte. Erwartungsgemäß zeigte sich bei der kalzium-supplementierten Plazebogruppe nach 24 Monaten eine 0,8-%ige BMD-Abnahme.

Daten der 10-mg-Alendronat- und der Plazebo-Gruppe Durchschnittliche prozentuale BMD-Veränderung an der Lendenwirbelsäule (± 1 SE) im Verlauf der Zeit



Nachfolgend sind die Daten aus seriellen Bestimmungen der BAP-Spiegel über einen Zeitraum von 2½ Jahren hinweg zusammengefaßt, die mit dem Assay Tandem Ostase für die Plazebo- und die 10-mg-Alendronat-Gruppe gemessen wurden. Die durchschnittliche prozentuale Abnahme gegenüber dem Grundlinienwert sowie die Standardfehlerlinien für BAP bei der Plazebo-Gruppe (BAP-Grundlinienwert = 17,7 µg/L \pm 6,0) und der Alendronat-Gruppe (BAP-Grundlinienwert = 17,0 µg/L \pm 4,6) sind an den einzelnen Zeitpunkten eingetragen. Die Daten zeigen eine zeitabhängige Abnahme der BAP-Spiegel bei der mit Alendronat behandelten Gruppe, die nach 6 Monaten einen Tiefpunkt erreicht. Erwartungsgemäß wurde bei der mit Kalzium supplementierten Plazebo-Gruppe eine geringe, vorübergehende Änderung der Marker-Spiegel beobachtet (26,27). Die Abnahme und anschließende Stabilisierung der BAP-Veränderungen in der mit Alendronat behandelten Gruppe lassen darauf schließen, daß es aufgrund der Behandlung mit Bisphosphonat zu einem neuen Gleichgewichtszustand im Knochenumbau kam (24,28,29).

Daten der 10-mg-Alendronat- und der Plazebo-Gruppe Durchschnittliche prozentuale BAP-Veränderung (± 1 SE) im Verlauf der Zeit



Die beobachteten Abnahmen der BAP-Spiegel in der mit Alendronat behandelten Gruppe, wie durch den Assay Tandem Ostase gemessen, unterscheiden sich bereits nach 3 Monaten und zu allen nachfolgenden Zeitpunkten (6, 12 und 24 Monate) erheblich vom Grundlinienwert ($p \leq 0,0001$). Im Gegensatz dazu nahmen die BAP-Spiegel in der Plazebo-Gruppe nach 3 und 6 Monaten um 11 % ab und kehrten nach 24 Monaten zum Grundlinienwert zurück.

Die in dieser Studie beobachteten BAP- und BMD-Veränderungen stimmen mit dem derzeitigen Wissensstand über den Knochenumbau und den Wirkungsmechanismus der Therapien zur Behandlung von Osteoporose überein (24). So läßt sich aus einer Abnahme des BAP-Spiegels, wie sie durch den Assay Tandem Ostase bei mit Alendronat behandelten Patientinnen gemessen wird, auf Veränderungen des Knochenumbaus schließen, die aus der Therapie zur Behandlung von Osteoporose resultieren.

Die prozentuale Veränderung zwischen beiden Serummarkerwerten muß sowohl die biologischen Marker-Schwankungen (einer Person) als auch die analytischen Schwankungen des Assays überschreiten, um klinische Bedeutung zu besitzen (30). Diese Schwelle wird als prozentuale Mindest-Veränderung bezeichnet. Prozentuale Marker-Veränderungen, welche über der prozentualen Mindest-Veränderung liegen, können auf eine Veränderung des klinischen Zustandes der Patientin, wie zum Beispiel einen Therapieerfolg, hinweisen (30). Die prozentuale Mindest-Veränderung für einen biochemischen Marker wurde von Soletormos (30) und anderen (31) mit der folgenden Gleichung ausgedrückt:

$$\text{Prozentuale Mindest-Veränderung} = \sqrt{2} \times Z \times \sqrt{VK_p^2 + VK_a^2}$$

Dabei gilt: VK_p = Schwankungen einer Person, VK_a = Assay-ungenauigkeit und Z = Z-Statistik, die von der als signifikant gewählten Wahrscheinlichkeit sowie davon abhängt, ob die erwartete Veränderung in eine Richtung ($Z = 1,645$) oder in zwei Richtungen ($Z = 1,96$) erfolgt.

Der VK_p -Wert für den Assay Tandem Ostase wurde aus Serumproben von 17 gesunden postmenopausalen Frauen bestimmt, die über einen Zeitraum von 5 Tagen hinweg täglich gesammelt wurden. Als durchschnittlicher biologischer Variationskoeffizient wurde ein Wert von 4,2 % berechnet.

Die analytischen Schwankungen basieren auf den Präzisionsdaten von Ansatz zu Ansatz, die im Abschnitt "SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE" dieser Gebrauchsinformation aufgeführt sind.

Als prozentuale Mindest-Veränderung für BAP (gemessen mit dem Assay Tandem Ostase) wurde 25 % berechnet. Dies bedeutet, daß bei postmenopausalen Frauen BAP-Veränderungen von mehr als 25 % auf Veränderungen im Knochenumbau zurückzuführen sind.

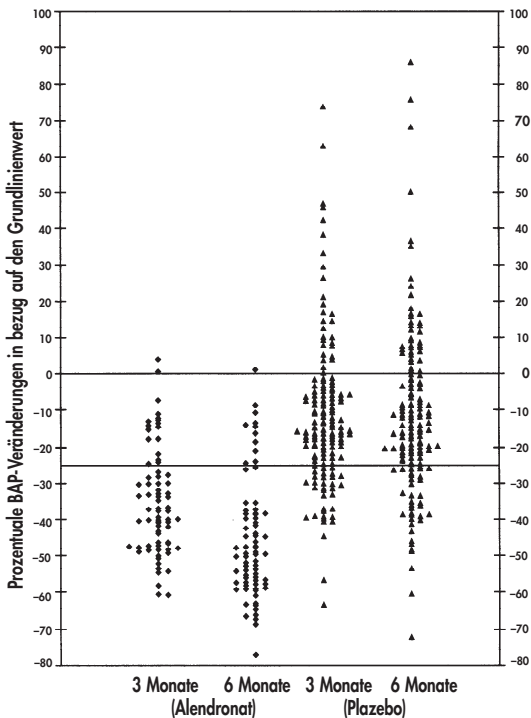
Nachfolgend sind die prozentualen BAP-Veränderungen einzelner Probanden in bezug auf den Grundlinienwert dargestellt. Eingetragen sind die Werte der Plazebo- und der 10-mg-Alendronat-Probanden nach 3 und 6 Monaten. Die horizontale Linie im Nullpunkt stellt den Grundlinienwert dar, die horizontale Linie bei -25 % repräsentiert die prozentuale Mindest-Veränderung für BAP, gemessen mit dem Assay Tandem Ostase. Bei der 10-mg-Alendronat-Gruppe zeigten 77,0 % (57/74) der Probanden nach 3 Monaten eine BAP-Abnahme (bezogen auf den Grundlinienwert zum Zeitpunkt 0) von 25 % oder mehr; 85,1 % (63/74) der Probanden zeigten zum Tiefpunkt (nach 6 Monaten) eine BAP-Abnahme von 25 % oder mehr. Nach 24 Monaten wiesen 90,3 % (65/72) eine BAP-Abnahme von 25 % oder mehr auf. In der kalzium-supplementierten Plazebo-Gruppe zeigten 75,7 % (112/148) der Probanden nach 6 Monaten eine BAP-Abnahme (bezogen auf den Grundlinienwert zum Zeitpunkt 0), die unter 25 % lag. Nach 24 Monaten zeigten 88,1 % (126/143) der Plazebo-Gruppe BAP-Abnahmen von weniger als 25 %. Diese Daten sind in der nachfolgenden Tabelle weiter zusammengefaßt. Die Tabelle zeigt die Anzahl und den Prozentsatz der mit Alendronat behandelten und der Plazebo-Probanden, deren BAP-Abnahme gegenüber dem Grundlinienwert < 25 % und > 25 % (nach 3 bzw. 6 Monaten) betrug.

Zusammenfassung der einzelnen, prozentualen BAP-Veränderungen in bezug auf den Grundlinienwert bei 10-mg-Alendronat- und Plazebo-Probanden Anzahl der Probanden/Gesamtanzahl der untersuchten Probanden

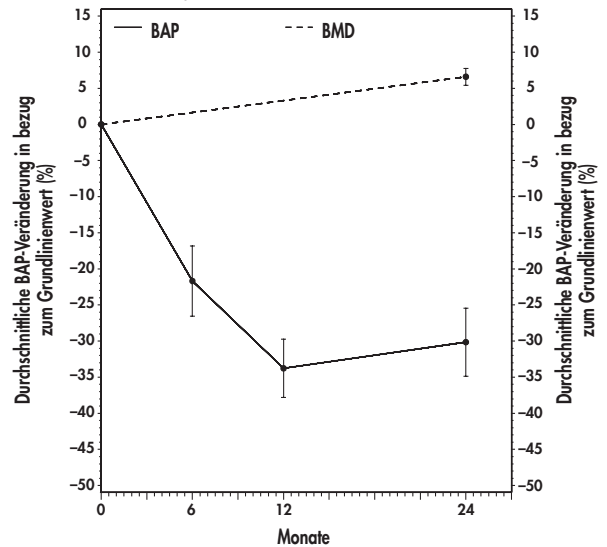
Prozentuale BAP-Veränderung (Grenzwert)	3 Monate		6 Monate	
	Plazebo N = 148	Alendronat 10 mg N = 74	Plazebo N = 148	Alendronat 10 mg N = 74
Abnahme von 25 % oder mehr	33/148 (22,3 %)	57/74 (77,0 %)	36/148 (24,3 %)	63/74 (85,1 %)
Abnahme von weniger als 25 %	115/148 (77,7 %)	17/74 (23,0 %)	112/148 (75,7 %)	11/74 (14,9 %)

Bei der 10-mg-Alendronat-Gruppe erfolgte zunächst nach 6 Monaten eine durchschnittliche BAP-Abnahme von 45,7 % (in bezug auf den Grundlinienwert) und anschließend nach 24 Monaten eine durchschnittliche BMD-Zunahme von 7,8 %. Umgekehrt zeigte sich bei der kalzium-supplementierten Plazebo-Gruppe nach 6 Monaten eine geringe BAP-Veränderung in bezug auf den Grundlinienwert (-11,3 %), die nach 24 Monaten mit einer geringen BMD-Abnahme von -0,8 % einherging.

Prozentuale BAP-Veränderungen in bezug auf den Grundlinienwert
10-mg-Alendronat- und Placebo-Probanden



Daten der mit Östrogen behandelten Gruppe
Durchschnittliche prozentuale Veränderung (± 1 SE) für BAP und Lendenwirbelsäulen-BMD
(in bezug zum Grundlinienwert) im Verlauf der Zeit



Zusammenfassend ergab sich folgendes:

- Die BAP-Spiegel reflektieren die Zunahme des Knochenbaus, die bei offensichtlich gesunden postmenopausalen Frauen mit Östrogenmangel einhergeht.
- Die BAP-Spiegel reflektieren Veränderungen im Knochenumbau, die als ein Ergebnis der Osteoporose-Therapie mit Alendronat bei postmenopausalen Frauen auftreten.
- Eine klinisch signifikante Abnahme der BAP-Spiegel nach 3 und 6 Monaten ist ein Indikator für Veränderungen im Knochenumbau. Die Wirksamkeit einer Therapie mit 10 mg Alendronat bei osteoporotischen postmenopausalen Frauen zeigt sich durch eine BMD-Zunahme nach 24 Monaten.
- Eine BAP-Abnahme von 25 % oder mehr in bezug auf den Grundlinienwert (gemessen mit dem Assay Tandem Ostase) kann Veränderungen im Knochenumbau anzeigen, die sich aus der Therapie zur Behandlung von Osteoporose ergeben.

Patientinnen, die sich einer Alendronat-Therapie zur Behandlung von Osteoporose unterziehen und deren gemessener BAP-Wert zunächst nicht um 25 % vom Grundlinienwert abnimmt, sollten zu einem späteren Zeitpunkt erneut getestet werden. Unter den 11 Probanden, die nach 6 Monaten in bezug auf den Grundlinienwert eine BAP-Abnahme von weniger als 25 % zeigten, wiesen 9 Probanden schließlich (nach 24 Monaten) eine BAP-Abnahme von >25 % auf. Alle diese Probanden reagierten auf 10 mg Alendronat, wie durch die BMD-Zunahme ermittelt wurde. Bei Patientinnen, deren BAP-Wert im Verlauf der Behandlung nicht um 25 % vom Grundlinienwert abnimmt, sollte die Wirksamkeit der Behandlung anhand anderer klinischer Methoden beurteilt werden.

Frauen nach der Menopause – Hormontherapie

Neben der oben beschriebenen Bisphosphonat-Studie wurden andere Studien durchgeführt, um die Eignung des Assays Tandem Ostase zu demonstrieren, Veränderungen im Knochenumbau als Reaktion auf eine Östrogentherapie wiederzugeben (29,32). Die Daten aus einer dieser Studien sind nachfolgend angegeben. Bei dieser Studie erhielten gesunde postmenopausale Frauen (n = 12) im Alter von 65–75 Jahren, denen die Gebärmutter nicht entfernt worden war, über 2 Jahre hinweg täglich eine Östrogen/Progesterin-Dosis (0,625nmg Premarin und 2,5 mg Provera). Darüber hinaus erhielten 6 gesunde Frauen, denen die Gebärmutter entfernt worden war, lediglich Östrogen. Insgesamt ergibt sich also eine Studienpopulation von 18 Frauen.

Der BAP-Spiegel wurde mit dem Assay Tandem Ostase als Grundlinienwert und nach 6, 12 und 24 Monaten gemessen. Die Lendenwirbelsäulen-BMD wurde als Grundlinienwert und nach 24 Monaten ausgewertet.

Die durchschnittlichen prozentualen Veränderungen (in bezug auf den Grundlinienwert) und die Standardfehlerlinien für Ostase (Y-Achse, links) und für BMD (Y-Achse, rechts) sind in der nachfolgenden Abbildung an den verschiedenen Zeitpunkten eingetragen. Bei den mit Östrogen behandelten Probanden zeigt sich eine 6,6-%ige BMD-Zunahme der Lendenwirbelsäule (in bezug auf den Grundlinienwert). Dies bedeutet, daß die Östrogentherapie eine positive Wirkung auf den Knochenumbau hatte. Die in der folgenden Abbildung dargestellten Daten zeigen auch eine zeitabhängige Abnahme der BAP-Spiegel bei der behandelten Gruppe, die nach 12 Monaten einen Tiefpunkt erreicht. Die beobachteten Abnahmen der BAP-Spiegel bei der mit Östrogen behandelten Gruppe (gemessen mit dem Assay Tandem-R Ostase) unterscheiden sich nach 6 Monaten und zu allen späteren Zeitpunkten (12 und 24 Monate) erheblich vom Grundlinienwert ($p \leq 0,0001$).

Die BAP- und BMD-Veränderungen in dieser Studie stimmen mit dem derzeitigen Wissensstand über Knochenumbau und Wirkungsmechanismus der Therapien zur Behandlung von Osteoporose überein (5,33). Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Abnahme der BAP-Spiegel, wie sie mit dem Assay Tandem Ostase bei mit Östrogen behandelten Frauen gemessen werden, Veränderungen im Knochen-Umsatz wiedergeben, die aus der Therapie zur Behandlung von Osteoporose resultieren.

Die Ergebnisse des Assays Tandem Ostase sollten nur in Verbindung mit weiteren Informationen verwendet werden, die aus der klinischen Patientenbewertung und anderen Diagnoseverfahren zur Verfügung stehen.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Präzision innerhalb eines Ansatzes

Die Präzision innerhalb eines Ansatzes wurde durch Analyse von vier Serum-Pools mit verschiedenen BAP-Konzentrationen bestimmt. Jeder Serum-Pool wurde in jeweils 20 Replikaten getestet. Die sich ergebenden Daten sind nachstehend aufgeführt:

Serum-Pool	1	2	3	4
Anzahl der Replikate	20	20	20	20
Mittelwert, µg/L	7,4	27,3	52,7	79,5
Standardabweichung	0,48	0,78	1,35	3,54
% VK	6,5	2,9	2,6	4,5

Präzision von Ansatz zu Ansatz

Die Präzision von Ansatz zu Ansatz wurde durch serielle Doppelbestimmungen von vier Serum-Pools in 20 einzeln kalibrierten Ansätzen ermittelt:

Serum-Pool	A	B	C	D
Anzahl der Assays	20	20	20	20
Mittelwert, µg/L	8,4	29,2	55,6	81,1
Standardabweichung	0,47	1,88	2,03	4,92
% VK	5,8	6,4	3,7	6,1

Wiederfindung und Verdünnung

Humansenen mit endogenem BAP wurden verschiedene Mengen einer Serumprobe mit erhöhtem BAP-Spiegel zugesetzt. Die Proben wurden als Dreifachbestimmung analysiert.

Zusatz µg/L	Erwartete Konzentration µg/L	Gemessene Konzentration µg/L	% Wiederfindung*
14,0	24,6	24,8	100,9
39,9	50,5	48,8	96,6
59,2	69,8	66,0	94,6
92,2	102,8	92,6	90,1

* % Wiederfindung = gemessene Konzentration geteilt durch erwartete Konzentration mal 100.

Eine Serumprobe mit erhöhtem BAP-Spiegel wurde mit dem Null-Verdüner/Kalibrator verdünnt und in mehreren Verdünnungen getestet.

Zusatz µg/L	Erwartete Konzentration µg/L	Gemessene Konzentration µg/L	% Wiederfindung*
Pur	N/Z	54,6	N/Z
1:4	27,3	27,9	102,3
1:6	18,2	17,4	95,4
1:8	13,7	12,7	92,8

* % Wiederfindung = gemessene Konzentration geteilt durch erwartete Konzentration mal 100.

Störsubstanzen

- **Hämoglobin**, das in Konzentrationen bis zu 500 mg/dL untersucht wurde, beeinflusst den Assay Ostase BAP nicht.
- **Unkonjugiertes und konjugiertes Bilirubin**, das in Konzentrationen bis zu 40 mg/dL bzw. 20 mg/dL untersucht wurde, beeinflusst den Assay Ostase BAP nicht.
- **Triglyceride** wurden in Konzentrationen bis zu 2000 mg/dL untersucht und beeinflussen den Assay Ostase BAP nicht.
- **Gesamprotein** wurde in Konzentrationen zwischen 3 und 14 g/dL untersucht und beeinflusst den Assay Ostase BAP nicht.
- 100 E/L Intestinal-ALP führten beim Assay Ostase BAP zu einem Ergebnis von 1,0 µg/L.
- 100 E/L Plazenta-ALP zeigten beim Assay Ostase BAP kein nachweisbares Ergebnis.

Reaktivität von Leber-ALP

Die Reaktivität von Leber-ALP mit dem Assay Ostase BAP wurde anhand von Serumproben von Patienten mit Leberleiden und von Serumproben von Patienten mit Paget-Syndrom ermittelt. Die Proben wurden einem elektrophoretischen Screening unterzogen und wiesen einen Gehalt von > 95 % Leber-ALP bzw. BAP auf.

Zur Beurteilung der Leber-ALP-Reaktivität wurden zwei Methoden eingesetzt. Das erste Verfahren, beschrieben von Moss und Whitby (35), verwendet eine Hitzedeaktivierung, die den Beitrag an endogenem BAP bei Proben mit erhöhten Leber-ALP-Spiegel minimiert. Mit dieser Methode ergab eine Leber-ALP-Reaktivität von 100 E/L beim Assay Ostase BAP Ergebnisse von 2,8 bis 3,4 µg/L.

Das zweite Verfahren, beschrieben von Price und Mitarbeitern (36), verwendet die Slope-Methode (Ostase BAP im Vergleich mit Gesamt-ALP), bei der keine Probenvorbereitung erfolgte. In dieser Studie wurde die mit dem Assay Ostase BAP vorgenommene quantitative Bestimmung von Leber-ALP- und BAP-Proben (Y-Achse) gegenüber der Gesamt-ALP-Aktivität (X-Achse) jeder Probe aufgetragen. Aus den Slope-Werten der Leber-ALP- und BAP-Proben ergab sich folgendes:

- 100 E/L Leber-ALP-Aktivität ergab beim Assay Ostase BAP ein Resultat von 6,2 µg/L; und
- 100 E/L BAP-Aktivität ergab beim Assay Ostase BAP ein Resultat von 36,9 µg/L.

Störeinflüsse durch Medikamente

Drei separaten Serum-Pools mit BAP-Gehalt wurden verschiedene Medikamentenkonzentrationen zugesetzt und die Proben dann im Vierfachansatz gemessen. Bei den Medikamenten und den maximalen getesteten Konzentrationen handelte es sich um die nachstehend aufgeführten. Der Test wurde auf der Grundlage der NCCLS-Richtlinie EP-7P (Interferenzuntersuchungen für klinische Tests) durchgeführt.

Paracetamol	20 mg/dL
Alendronat	5 mg/dL
Aspirin	50 mg/dL
Calcitonin (Salm)	112 IE/dL
Calcium	20 mg/dL
Östrogen	400 ng/dL
Etidronat	105 mg/dL
Ibuprofen	40 mg/dL
Pamidronat	18 mg/dL
Progesteron	25 mg/dL
Vitamin D	80.500 IE/dL

Diese Medikamente hatten bei der Bestimmung mit dem Assay Ostase BAP keinen Einfluß auf die BAP-Wiederfindung in den Serum-Pools.

Testempfindlichkeit

Der geringste mit dem Assay Ostase BAP nachweisbare BAP-Spiegel beträgt schätzungsweise 0,7 µg BAP/L. Der geringste nachweisbare Spiegel ist definiert als der BAP-Spiegel, der einer Extinktion entspricht, die um zwei Standardabweichungen über dem mittleren Extinktionswert von 20 Replikatmessungen des Null-Verdünners/Kalibrators liegt.

Der Kauf dieses Kits berechtigt zu seiner Verwendung unter US-Patent-Nr. 4,376,110 und 4,486,530.

Tandem® und Ostase® sind eingetragene Warenzeichen von Hybritech Incorporated, einer Tochtergesellschaft von Beckman Coulter, Inc.

*Tween ist ein Warenzeichen von ICI Americas, Inc.

Ostase® BAP

Test Immunoenzimetrico



Per la determinazione quantitativa della **Fosfatasi Alcalina Osso-specifica (BAP)** nel siero umano.

FINALITÀ DEL PRODOTTO

Il test immunoenzimetrico Ostase BAP è uno strumento per l'analisi in vitro per la determinazione quantitativa della fosfatasi alcalina osso-specifica (BAP), un indicatore dell'attività osteoblastica, nel siero umano. Tale strumento viene utilizzato quale ausilio nella gestione dell'osteoporosi postmenopausale e del morbo di Paget.

CARATTERISTICHE GENERALI

L'osso è un tessuto dinamico in cui formazione e rimozione ossea (detta anche riassorbimento) continuano per tutta la vita in un processo chiamato rimodellamento. Tale processo è una funzione di interazioni complesse tra due tipi di cellule ossee: gli osteoblasti, responsabili della formazione ossea e gli osteoclasti, addetti al riassorbimento. (1,3) La formazione e il riassorbimento osseo sono processi interdipendenti e, in circostanze normali, strettamente associati. (2,4) Tale relazione è parte integrante del mantenimento della competenza biochimica dello scheletro, in tal modo conservando l'organizzazione della struttura, forma e forza delle ossa. (2,3,5)

Si ritiene che le concentrazioni sieriche di BAP riflettano lo stato metabolico degli osteoblasti (6,7). Una valutazione accurata del metabolismo osseo è essenziale per la determinazione della gravità della patologia ossea metabolica e della risposta alla terapia. I dosaggi delle concentrazioni sieriche di BAP si sono dimostrate uno strumento utile per la valutazione dei pazienti affetti dal morbo di Paget, osteomalacia, iperparatiroidismo primario, osteodistrofia renale, osteoporosi e metastasi ossee (6-10). Le determinazioni di fosfatasi alcalina totale sono ormai una metodica accettata per la diagnosi e il monitoraggio dei pazienti affetti dal morbo di Paget.

Il morbo di Paget è una patologia scheletrica comune nella quale si verifica una proliferazione focale dei normali componenti cellulari ossei. È più diffuso di quanto una volta si ritenesse, in quanto presenta un'incidenza in alcune popolazioni del 3-4% nei pazienti di mezza età e del 10-15% nei pazienti anziani (11). Questa patologia non colpisce i giovani. Il morbo di Paget è, nella maggior parte dei pazienti, asintomatico e quindi spesso non è diagnosticato, salvo che non venga evidenziato da una radiografia o da livelli di fosfatasi alcalina sierica fuori norma, nel corso di un esame clinico per altre cause. Nei pazienti sintomatici la malattia si manifesta con dolore e deformità.

Il rischio di osteoporosi, un'altra alterazione del rimodellamento osseo, dipende in parte dallo sviluppo scheletrico, dal raggiungimento di valori di picco di massa ossea, e, in seguito nel corso dell'esistenza, da perdita ossea. Nei bambini sani, la formazione ossea è superiore al riassorbimento, determinando normale sviluppo osseo e crescita scheletrica (3). Nei giovani sani, formazione e riassorbimento ossei si equilibrano, ciò che non determina alcuna crescita o riduzione della massa scheletrica. Con l'avanzare dell'età, sia negli uomini che nelle donne si verifica uno squilibrio nel rimodellamento osseo per cui il riassorbimento è leggermente superiore alla formazione portando, col passare del tempo, a una continua perdita netta di massa ossea (1,2,4,12). Se tale squilibrio persiste, la massa ossea può ridursi fino a che lo scheletro non risulta insufficiente a resistere alle normali sollecitazioni meccaniche, divenendo quindi particolarmente soggetto a fratture. Questa perdita di massa ossea in eccesso, unita a una maggiore predisposizione alle fratture, è l'alterazione nota come osteoporosi (5).

La forma più comune di osteoporosi si verifica nelle donne postmenopausali a causa della deficienza di estrogeni (2,12,13). Una rapida perdita ossea accompagna la diminuzione dei livelli di estrogeni all'inizio della menopausa o può dipendere dall'asportazione chirurgica delle ovaie. Una rapida perdita ossea si verifica a seguito degli effetti combinati di uno scompenso nel rimodellamento osseo e di un aumento del turnover osseo (5,14-16). Negli Stati Uniti, l'osteoporosi colpisce approssimativamente 25 milioni di donne postmenopausali ed è causa di circa 1,5 milioni di fratture all'anno, di cui circa 500.000 fratture vertebrali, 250.000 fratture dell'anca e 200.000 fratture del radio distale (2,5,17).

La terapia ormonale sostitutiva è attualmente la più prescritta per la prevenzione di fratture osteoporotiche in donne postmenopausali (4,5,18-20), sebbene molte donne non possano, o non vogliono, avvalersi di tale terapia a causa del potenziale aumento del rischio di cancro e della ripresa del flusso mestruale. Per questo motivo, per il trattamento dell'osteoporosi sono stati messi a punto altri composti, quali i bifosfonati, che sono attualmente una terapia standard per il morbo di Paget. Le proprietà anti-riassorbimento dei bifosfonati diminuiscono il rimodellamento osseo e, di conseguenza, la perdita ossea globale.

I marker biochimici sono utili nel monitoraggio delle patologie ossee di natura metabolica. L'idrossiprolina urinaria e la fosfatasi alcalina totale del siero sono state utilizzate per monitorare il trattamento del morbo di Paget. Tuttavia, l'osteoporosi rappresenta una modifica più sottile del processo di rimodellamento osseo e pertanto sono necessari dei marker più specifici e sensibili.

Il test Ostase BAP è uno strumento per l'analisi in vitro per la determinazione quantitativa della fosfatasi alcalina osso-specifica (BAP) nel siero umano. Variazioni nelle concentrazioni di BAP si sono rivelate utili nei pazienti sottoposti a terapia per alterazioni ossee di tipo metabolico (6,7,10,21,22).

PRINCIPIO DEL METODO

Il test Ostase BAP è un dosaggio immunoenzimetrico di anticorpo monoclonale in fase solida. I campioni contenenti BAP vengono fatti reagire con una soluzione contenente anticorpi monoclonali BAP-specifici marcati biotina. La reazione avviene in strisce di pozzetti in plastica (fase solida) rivestiti con streptavidina e racchiusi in un supporto di plastica. In seguito alla formazione del complesso fase solida/anticorpi a cattura/BAP, la micropiastre viene lavata al fine di rimuovere la BAP non legata, e quindi incubata con un substrato enzimatico. La quantità di turnover di su substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza della reazione estinta a 405 nm in un lettore per micropiastre. L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di BAP presente nel campione in esame. Il calcolo della concentrazione di BAP nel campione si basa sull'analisi simultanea dei calibratori BAP e del Calibratore Zero/Diluyente.

CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

Componenti	Cat. n.AC-20F1 96 Test
Coniugato [CONJ] Anti-BAP (IgG monoclonali di topo) con biotina, matrice proteica bovina-equina con 0,09% di sodio azide.	1 x 14 mL
Micropiastre [MICROPLAT] Strip di pozzetti in plastica rivestiti di streptavidina in un portastrip in plastica. Essiccante: gel di silice.	1 x 96 pozzetti
Calibratore Zero/Diluyente (0) [CAL 0] Matrice proteica bovina senza alcuna concentrazione rilevabile di BAP (0 µg BAP/L) e 0,09% di sodio azide.	1 x 14 mL
Calibratori (1-5) [CAL 1] - [5] Matrice proteica bovina contenente approssimativamente 7, 15, 30, 60 e 90 µg di BAP umano/L e 0,09% di sodio azide. Vedi scheda calibratori per i valori assegnati.	5 x 1 mL
Controllo basso (1) [CTRL 1] Matrice proteica bovina contenente approssimativamente 11 µg BAP umano/L e 0,09% di sodio azide. Fare riferimento alla rapporto del controllo di qualità per i range assegnati.	1 x 1 mL
Controllo alto (2) [CTRL 2] Matrice proteica bovina contenente approssimativamente 45 µg BAP umano/L e 0,09% di sodio azide. Fare riferimento alla rapporto del controllo di qualità per i range assegnati.	1 x 1 mL
Concentrato di lavaggio [WASHBUF 20X] Soluzione salina tamponata con fosfato contenente Tween.	1 x 50 mL
Substrato [SUBS]pNPP p-nitrofenil fosfato in tampone stabilizzante contenente conservanti.	1 x 20 mL
Reagente estinguente [NaOH] Idrato di sodio 1 N.	1 x 14 mL
Rapporto del controllo di qualità, Inserto istruzioni	1 per kit

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. **Esclusivamente per uso diagnostico in vitro.**
2. **Non pipettare per bocca.**
3. **Non mangiare, bere o fumare nelle zone di lavoro designate.**
4. **Lavarsi accuratamente le mani dopo aver manipolato i campioni e i reagenti del kit.**
5. Il materiale di origine umana contenuto in alcuni componenti di questo kit è stato controllato con metodiche approvate dalla FDA ed è risultato negativo per la presenza degli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1 e HIV-2), degli anticorpi del virus dell'epatite C, nonché dell'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg). Nessun metodo di controllo finora conosciuto offre comunque una sicurezza assoluta circa l'assenza dei virus dell'HIV1, HIV2, dell'Epatite B, dell'epatite C o di altri agenti infettivi. **Maneggiare quindi questi reagenti come potenzialmente infettivi** (23).
6. La sodio azide può dar luogo a reazioni chimiche pericolose. Per lo smaltimento dei residui delle analisi attenersi scrupolosamente alle norme CDC e alle norme di legge in materia (24).
7. Il Reagente estinguente di questo kit contiene 1 N NaOH, un corrosivo che causa ustioni. Evitare il contatto con pelle e occhi. Non ingerire né inalare. In laboratorio indossare occhiali di sicurezza, guanti e camice.
8. **Evitare la contaminazione microbica dei reagenti quando se ne prelevano aliquote dai flaconcini.**

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- I reagenti Ostase BAP sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione, se conservati a una temperatura di 2-8°C.
- Il Concentrato di lavaggio e il Reagente estingente sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta se conservati a una temperatura di 2-30°C.
- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C) prima del loro utilizzo. Dopo l'uso conservare tutti i reagenti, tranne la soluzione di Lavaggio, a una temperatura di 2-8°C.
- Il recupero delle concentrazioni di controllo del kit deve rientrare nei range stabiliti.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere riposte nel tray di plastica con l'essiccante fornito, e conservate a 2-8°C.
- Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- Non è necessaria una preparazione speciale del paziente.
- Si raccomanda di prelevare campioni di sangue interi mediante tecniche mediche accettate.
- Lasciar coagulare il campione di sangue e separare il siero mediante centrifugazione.
- I campioni vanno prelevati in modo da evitare l'emolisi.
- Il test Ostase BAP va effettuato su un campione di siero. La validità dell'analisi su campioni di plasma non è ancora stata accertata.
- Se il campione di siero deve essere analizzato entro 24-48 ore dal prelievo, conservare il campione in frigorifero a una temperatura di 2-8°C.
- In caso di periodi di conservazione più lunghi (fino a due mesi), congelare i campioni ad almeno -70°C.
- Campioni di siero torbidi o contenenti particelle devono essere centrifugati prima dell'analisi.

MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

- Pipettatori di precisione con puntali monouso: volume fisso o regolabile a 50, 100, e 150 µL ($\pm 1\%$). In alternativa, si possono utilizzare pipette di precisione multicanali e cuvette a V per l'aggiunta di coniugato anti-BAP, reagente Substrato e Reagente estingente.
- Puntali monouso per pipette da 50, 100, 150 µL
- Provette per la diluizione dei campioni
- Lavatore per micropiastre
- Aspiratore
- Acqua distillata
- Timer
- Contenitore per la conservazione della soluzione di Lavaggio
- Lettore per micropiastre (lunghezza d'onda primaria 405 nm, sottrazione background 600-650 nm) e software di riduzione dati.
- Rotatore orizzontale per micropiastre (da 500 rpm a 900 rpm)

Per maggiori informazioni su un sistema completo di manipolazione reagenti, sul sistema di riduzione dati e le apparecchiature per la manipolazione dei liquidi, contattare il rappresentante più vicino.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C) prima del loro utilizzo.
- Mescolare con cura i reagenti prima dell'uso, agitandoli delicatamente o facendoli roteare.
- Utilizzare un puntale di pipetta pulito per ciascun campione, calibratore o controllo al fine di evitarne la contaminazione.
- Soluzione di Lavaggio: per preparare la soluzione di Lavaggio aggiungere il Concentrato di lavaggio a 950 mL di acqua distillata e mescolare.

PROCEDURA

- Il test Ostase BAP si effettua a temperatura ambiente. Portare tutti i campioni di siero e i componenti del kit a temperatura ambiente (18-25°C) e mescolarli bene prima dell'uso.
- Il Calibratore Zero/Diluente, i calibratori e i controlli devono essere testati in duplicato nello stesso supporto per micropiastre.
- Poiché il termine di ciascuna incubazione arresta la reazione in corso, (es. legame di anticorpi o turnover di substrato), per una corretta calibrazione dell'analisi i tempi di incubazione devono essere gli stessi per tutti i pozzetti.

La procedura d'analisi è la seguente:

1. Contrassegnare le strip d'analisi e i supporti in modo adeguato e caricare le strip nei relativi supporti. Per ciascuna analisi testare in duplicato ciascuno dei 6 calibratori e i controlli alto e basso.
2. Pipettare 50 µL del Calibratore Zero/calibratori B-F/controlli/campioni dei pazienti sul fondo dei relativi pozzetti.
3. Pipettare 100 µL di coniugato in ciascun pozzetto.
4. Incubare per 1 ora a 18-25°C su un rotatore orizzontale regolato a 500-900 rpm.
5. Lavare i pozzetti della micropiastre 3 volte nel seguente modo:
 - a) Aspirare il liquido dalla prima striscia.
 - b) Pipettare 300 µL di soluzione di Lavaggio nella prima striscia.
 - c) Ripetere le fasi a e b per tutte le altre strisce.
 - d) Ripetere due volte le fasi a e c.
6. Dispensare 150 µL di reagente Substrato in ciascun pozzetto. Procedere immediatamente alla fase successiva.
7. Incubare per 13-15 minuti a 18-25°C su un rotatore orizzontale regolato a 500-900 rpm. Procedere immediatamente alla fase successiva.
8. Dispensare 100 µL di Reagente estingente in ciascun pozzetto.
9. Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a 405 nm in un lettore per micropiastre, sottraendo la lettura del bianco a 600-650 nm per ciascun pozzetto. Leggere la micropiastre entro 1 ora dall'estinzione della reazione.
10. Calcolare i risultati così come descritto nel paragrafo "Strumentazione e Calcolo dei Risultati".

COMMENTI PROCEDURALI

1. **Nota sul lavaggio delle micropiastre:** I test immunoenzimetrici richiedono un lavaggio accurato al fine di eliminare gli anticorpi marcati biotina non legati. Pertanto è fondamentale lavare a fondo ciascun pozzetto, asciugando tutte le goccioline della soluzione di Lavaggio per ottenere dei risultati ottimali.
2. Se un campione risulta contenere una concentrazione di BAP superiore al calibratore più elevato, tale campione dovrà essere diluito con il Calibratore Zero/Diluente ed analizzato in base alla Procedura d'Analisi. Includere il fattore di diluizione nel calcolo dei risultati. Mescolare accuratamente ciascun campione diluito prima dell'analisi. Le diluizioni consigliate per campioni contenenti concentrazioni di BAP maggiori del calibratore più elevato sono 1:3, 1:5 o 1:10. Tuttavia, è preferibile diluire i campioni di siero che contengono concentrazioni di BAP superiori al calibratore più elevato, in modo che il campione diluito abbia un valore superiore a 10 µg di BAP/L.
3. Poiché l'assorbanza è funzione della temperatura e della durata dell'incubazione del reagente Substrato, è molto importante che tale incubazione sia identica per tutti i pozzetti/Le micropiastre. Ciò si può ottenere assicurandosi che il tempo necessario per pipettare i reagenti dall'inizio alla fine - senza interruzioni - sia esattamente lo stesso sia per l'aggiunta del reagente Substrato, che per l'aggiunta del Reagente estingente. Per migliori risultati, il tempo necessario per l'aggiunta di tali reagenti non deve superare i 90 secondi, e l'incubazione totale del substrato non deve superare i 15 minuti.
4. Per maggiore praticità, per dispensare coniugato, soluzione di Lavaggio, reagente Substrato e Reagente estingente è possibile utilizzare un pipettatore a ripetizione o multicanale. Si raccomanda di utilizzare pipette con puntali monouso per pipettare i calibratori, i controlli e i campioni. Cambiare il puntale della pipetta dopo aver pipettato ciascun campione, al fine di evitare un potenziale carryover di campione e la contaminazione dei reagenti o dei campioni.
5. Non mischiare materiali provenienti da lotti diversi.

STRUMENTAZIONE E CALCOLO DEI RISULTATI

I risultati si possono calcolare con metodi computerizzati o manualmente su carta millimetrata lineare.

Metodo computerizzato

Si consiglia di utilizzare una curva punto-a-punto. Un software punto-a-punto che collega con una linea retta la media dei replicati dei calibratori - incluso il calibratore 0 (BAP/L) - dà buoni risultati con le procedure e i metodi di calibrazione descritti. Per informazioni più dettagliate sulla riduzione dei dati computerizzata consultare il rappresentante più vicino.

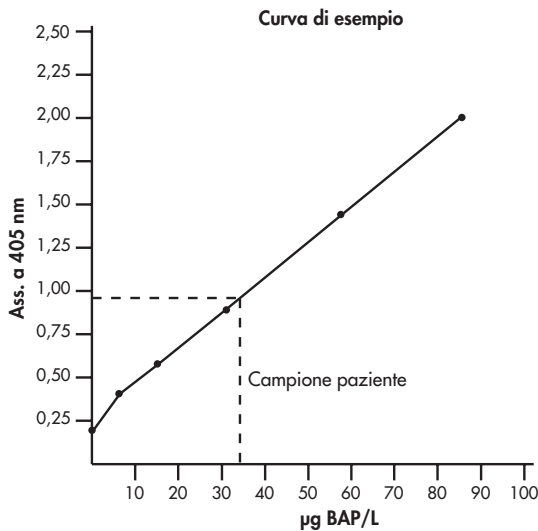
Metodo manuale

La curva di calibrazione Ostase BAP può essere costruita manualmente su carta millimetrata lineare inserendo l'assorbanza media per ciascun calibratore sull'asse delle ordinate e la concentrazione di BAP nel calibratore sull'asse delle ascisse. Tracciare una curva punto-a-punto che passi per i punti di calibrazione. Non forzare la curva in una linea retta.

Per determinare la concentrazione di BAP nei controlli e nei campioni dei pazienti, tracciare una linea orizzontale dal valore di assorbanza per il campione in esame alla curva di calibrazione. Al punto d'intersezione tra la linea orizzontale e la curva, tracciare una linea verticale sull'asse delle ascisse e leggere la concentrazione di BAP.

Se, per qualunque replicato del campione, l'assorbanza è superiore all'assorbanza del calibratore più alto, il campione deve essere diluito e rianalizzato. La concentrazione osservata del campione diluito deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.

Dati esemplificativi					
Pozzetto n.	Descrizione	Ass. 405 nm	Media Ass.	BAP µg/L	
1	Calibratore (0)	0,193			
2		0,187	0,190	0,0	
3	Calibratore (1)	0,401			
4		0,402	0,402	7,2	
5	Calibratore (2)	0,595			
6		0,572	0,584	15,5	
7	Calibratore (3)	0,908			
8		0,866	0,887	31,9	
9	Calibratore (4)	1,499			
10		1,460	1,479	58,4	
11	Calibratore (5)	2,000			
12		2,051	2,026	85,8	
13	Campione paziente	0,911		33,0	



CONTROLLO QUALITÀ E ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

Le corrette pratiche di laboratorio prevedono l'uso di campioni di controllo intra-serie per assicurare la validità di tutti i reagenti e protocolli. Il kit anticorpale Ostase BAP contiene dei controlli che servono a verificare la validità del sistema.

1. Il recupero delle concentrazioni di controllo deve rientrare nei range stabiliti.
2. Il coefficiente di variazione (%CV) dei valori di assorbanza a 405 nm per ciascun calibratore e campione di controllo deve essere inferiore al 10%.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Interferenza HAMA: Alcuni individui possiedono anticorpi anti-proteine murine (HAMA) che possono causare interferenza in analisi che utilizzano anticorpi derivati da topi. In particolare, è stato osservato che i campioni di siero di pazienti sottoposti a terapie o a procedure diagnostiche che prevedono l'infusione di anticorpi monoclonali di topo, possono generare risultati errati in tali analisi. Pertanto, i risultati Ostase BAP di tali pazienti dovranno essere utilizzati esclusivamente insieme ai risultati di altre procedure diagnostiche e ai dati del quadro clinico del paziente.

Con il test Ostase BAP si è determinata l'immunoattività di ALP epatica: 100 U/L di attività ALP epatica forniscono con il test Ostase BAP valori da 2,8 a 6,2 µg/L. I campioni di siero con valori significativamente elevati di attività ALP epatica possono produrre risultati elevati con il test Ostase BAP. I pazienti con alterazioni ossee metaboliche che presentano bassi livelli di attività patologica possono avere delle concentrazioni ALP osso-specifiche che rientrano nei valori attesi del test Ostase BAP.

I risultati del test Ostase BAP devono essere utilizzati esclusivamente insieme ai dati del quadro clinico dei pazienti e di altre procedure diagnostiche. Pertanto, il test Ostase BAP non è consigliato come procedura di screening per rilevare la presenza di osteoporosi nella popolazione in genere. Inoltre, il test Ostase BAP non può essere utilizzato per valutare il tasso di formazione ossea e di rimodellamento osseo.

VALORI ATTESI

I risultati BAP riportati nella sezione Valori Attesi e Studi Clinici sono stati generati col test Tandem-R Ostase. Tuttavia, uno studio comparativo fra le analisi Ostase BAP e Tandem-R Ostase ha dimostrato una buona concordanza fra le analisi ($y = 1,02x + 0,28$, $r = 0,9700$, $n = 136$).

Il test Tandem-R Ostase è stato valutato in studi effettuati in 6 centri di analisi a cui hanno partecipato soggetti adulti apparentemente sani di età compresa tra 20 e 89 anni. La tabella seguente mostra la concentrazione media di BAP, la deviazione standard (DS), la mediana e il 95° di percentile di uomini (N = 217), donne premenopausali (N = 228) e donne postmenopausali (N = 529).

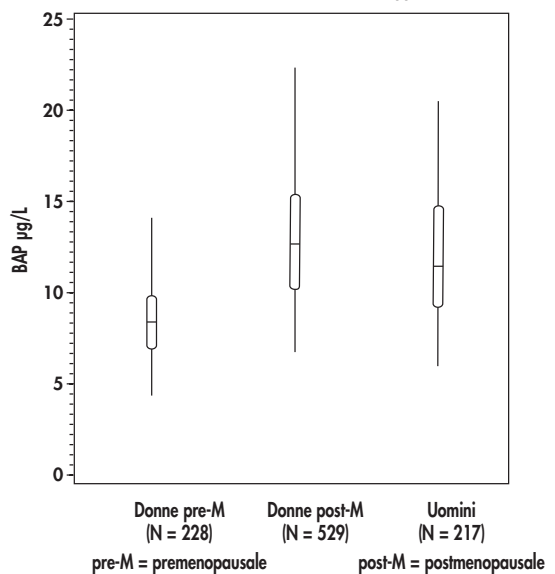
Riepilogo delle concentrazioni di BAP in adulti apparentemente sani*

	N	Media BAP µg/L	DS	Mediana BAP µg/L	BAP 95° Percentile µg/L
Uomini	217	12,3	4,3	11,6	20,1
Donne Pre-menopausali	228	8,7	2,9	8,5	14,3
Donne Post-menopausali	529	13,2	4,7	12,5	22,4

* Risultati ottenuti con il test immunoradiometrico Tandem-R Ostase

I risultati della tabella mostrano che le concentrazioni medie di BAP nella popolazione di donne postmenopausali sono più elevate rispetto alle concentrazioni medie di BAP nelle donne premenopausali ($p \leq 0,0001$). Questo aumento della media BAP riflette l'incremento di rimodellamento osseo associato a carenza di estrogeni nella popolazione postmenopausale rispetto a quella premenopausale (2,8,12,13). Tuttavia, si registra una considerevole sovrapposizione dei valori di BAP nelle popolazioni indicate nella distribuzione seguente:

Distribuzione delle concentrazioni di BAP in adulti apparentemente sani*



* Risultati ottenuti con il test immunoradiometrico Tandem-R Ostase

Per ciascuna delle popolazioni indicate nello schema: 1) Le linee orizzontali di ciascun riquadro rappresentano le concentrazioni mediane; 2) I margini superiori e inferiori di ciascun riquadro rappresentano i range interquartili - cioè, il margine superiore delimita il 25% dei valori al di sopra della mediana, mentre quello inferiore delimita il 25% dei valori al di sotto della mediana; 3) La punta di ciascun "baffo" inferiore rappresenta la concentrazione del 5° di percentile, mentre la punta di ciascun baffo superiore rappresenta la concentrazione del 95° di percentile.

Il range di osservazione sopra riportati sono rappresentativi unicamente di questo studio e non riflettono necessariamente i range di un determinato laboratorio. Ciascun laboratorio dovrà pertanto stabilire il proprio intervallo di riferimento.

STUDI CLINICI

Morbo di Paget

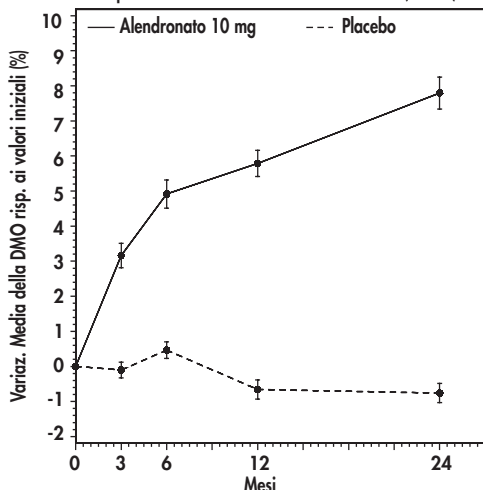
Sono stati effettuati degli studi comparativi per confrontare le concentrazioni di BAP nel siero ottenute mediante il test Tandem-R Ostase con i risultati ottenuti mediante due metodiche elettroforetiche attualmente in commercio e due analisi di attività enzimatica della fosfatasi alcalina totale (TAP). Questi studi sono stati effettuati presso dei centri clinici di ricerca su 100 campioni di pazienti affetti da morbo di Paget. Il coefficiente di correlazione (r) tra il test Tandem-R Ostase e le metodiche elettroforetiche è risultato pari a 0,9418, mentre il coefficiente di correlazione (r) tra Tandem-R Ostase e le analisi di attività enzimatica della fosfatasi alcalina totale è risultato 0,9459.

Osteoporosi Postmenopausale – Terapia con i Bifosfonati

È stato effettuato uno studio su pazienti affetti da osteoporosi clinicamente definita e sottoposti a terapia con un bifosfonato (sodio alendronato), allo scopo di dimostrare la capacità dell'analisi Tandem-R Ostase di riflettere alterazioni del rimodellamento osseo in seguito a terapia per l'osteoporosi postmenopausale. Si trattava di uno studio multicentrico, prospettico, in doppio cieco e controllato verso placebo (25). Più avanti sono indicati i risultati dei soggetti che sono stati randomizzati per il placebo (N = 148) o per l'alendronato 10 mg (N = 74). Tutti i soggetti hanno assunto integrazioni quotidiane di calcio di 500 mg. I valori di densità minerale ossea (DMO) sono stati ottenuti a livello di colonna vertebrale lombare mediante densitometria a doppio raggio fotonico, mentre le determinazioni di BAP seriale sono state calcolate con il test Tandem Ostase.

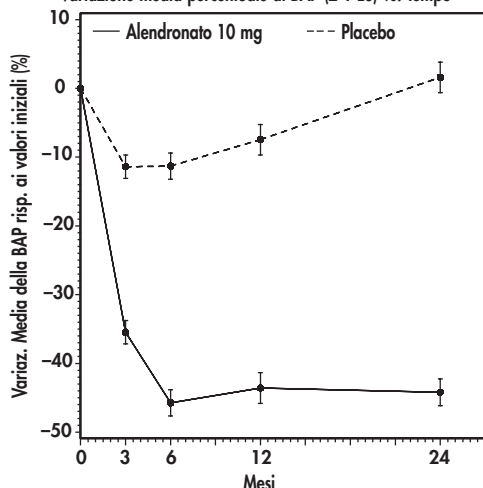
Le variazioni percentuali medie rispetto ai valori iniziali e le barre di errore standard per la DMO nel gruppo del placebo e in quello sotto trattamento sono indicate a ciascun tempo di valutazione nella figura sotto riportata. Dopo 24 mesi nel gruppo dell'alendronato si è osservato un incremento del 7,8% della DMO rispetto ai valori iniziali, indicando quindi che la terapia con bifosfonati ha avuto effetti positivi a livello osseo. Come ci si attendeva, dopo 24 mesi nel gruppo trattato con placebo e integrazioni di calcio si è registrata una riduzione dello 0,8% della DMO.

Dati Gruppi Alendronato 10 mg e Placebo
Variazione minima percentuale della DMO a livello lombare (± 1 ES) vs. Tempo



Il sommario seguente riporta le concentrazioni seriali di BAP misurate per due anni con il test Tandem Ostase nei gruppi trattati con placebo e con alendronato 10 mg. Le riduzioni percentuali medie rispetto ai valori iniziali e le barre di errore standard per la BAP dei gruppi del placebo (valore di BAP iniziale = $17,7 \mu\text{g/L} \pm 6,0$) e dell'alendronato (valore di BAP iniziale = $17,0 \mu\text{g/L} \pm 4,6$) sono indicate a ciascun tempo di valutazione. I dati mostrano una riduzione tempo-dipendente delle concentrazioni di BAP per il gruppo trattato con alendronato, che raggiunge il nadir dopo 6 mesi. Come ci si attendeva, si è osservato un lieve cambiamento temporaneo nei livelli del marker nel gruppo trattato con placebo e integrazioni di calcio (26,27). La riduzione e conseguente stabilizzazione delle variazioni di BAP nel gruppo trattato con alendronato indicano che si è raggiunta una nuova fase di stabilità nel rimodellamento osseo a seguito della terapia con bifosfonati (24,28,29).

Dati Gruppi Alendronato 10 mg e Placebo
Variazione media percentuale di BAP (± 1 ES) vs. Tempo



Le riduzioni delle concentrazioni di BAP osservate per il gruppo trattato con alendronato, misurate con il test Tandem Ostase, sono significativamente diverse rispetto ai valori iniziali ($p \leq 0,0001$) già dopo 3 mesi e a tutti i successivi tempi di valutazione (6, 12, e 24 mesi). Al contrario, le concentrazioni di BAP si sono ridotte dell'11% a 3 e 6 mesi nel gruppo del placebo e sono ritornate ai valori iniziali dopo 24 mesi.

Le variazioni di BAP e di DMO in questo studio riflettono alle attuali conoscenze riguardo il rimodellamento osseo e il meccanismo d'azione delle terapie anti-osteoporotiche (24). Da questi risultati si può concludere che la riduzione delle concentrazioni di BAP misurata con il test Tandem Ostase nei soggetti sottoposti a terapia con alendronato riflette delle variazioni nel rimodellamento osseo dovute alla terapia anti-osteoporotica.

Per avere significanza clinica, la variazione percentuale fra due valori di marker sierici deve superare sia la variazione biologica (intra-soggetto) del marker che la variazione analitica dell'analisi (30). Tale soglia viene indicata come variazione percentuale minima. Variazioni percentuali di un marker che vanno oltre la variazione percentuale minima possono essere attribuite a un cambiamento nello stato clinico del soggetto, quale la risposta alla terapia (30). La variazione percentuale minima per un marker biochimico è stata descritta da Soletormos (30) e altri (31) con la formula

$$\text{variazione minima percentuale} = \sqrt{2 \times Z \times \sqrt{CV_p^2 + CV_a^2}}$$

dove: CV_p è la variabilità intra-soggetto, CV_a è l'imprecisione dell'analisi, e Z è la Z-statistica, che dipende dalla probabilità scelta per la significatività e dal fatto se la variazione attesa è unidirezionale ($Z = 1,645$) o bidirezionale ($Z = 1,96$).

La variabilità intra-soggetto del test Tandem Ostase è stata determinata su campioni di siero provenienti da 17 donne sane postmenopausali, prelevati ogni giorno per un periodo di 5 giorni. Il coefficiente biologico medio di variazione è risultato pari a 4,2%.

La variazione analitica si è basata sui dati di precisione inter-serie riportati nel paragrafo CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL METODO di questo inserto.

La variazione percentuale minima per la BAP misurata con il test Tandem Ostase è risultata pari al 25%. Pertanto, variazioni di concentrazione di BAP in donne postmenopausali che superano il 25% possono essere attribuite a variazioni del rimodellamento osseo.

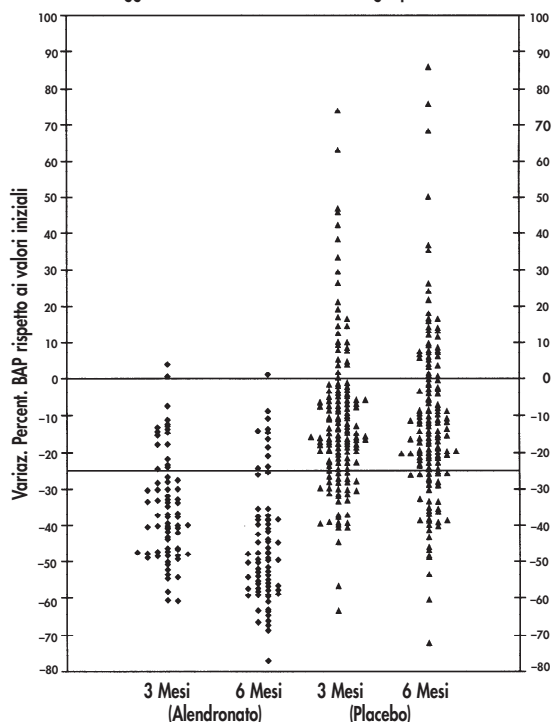
Di seguito sono riportate le variazioni percentuali di BAP relative ai valori iniziali per singoli soggetti. Vengono presentati i dati di pazienti trattati con placebo e l'alendronato 10 mg a 3 e 6 mesi. La linea orizzontale a zero rappresenta i valori iniziali, mentre la linea orizzontale a -25% rappresenta la variazione percentuale minima per la BAP misurata con il test Tandem Ostase. Per il gruppo dell'alendronato 10 mg, il 77,0% (57/74) dei soggetti ha registrato un decremento della BAP rispetto ai valori iniziali (tempo 0) di almeno il 25% a 3 mesi, mentre nell'85,1% (63/74) dei soggetti si è riscontrato un decremento di BAP rispetto ai valori iniziali di almeno il 25% al nadir (6 mesi). A 24 mesi, il 90,3% (65/72) mostrava un decremento di BAP di almeno il 25%. Per il gruppo trattato con placebo e integrazioni di calcio, il 75,7% (112/148) dei soggetti presentava una diminuzione di BAP rispetto ai valori iniziali (tempo 0) inferiore al 25% (a 6 mesi). A 24 mesi, l'88,1% (126/143) dei soggetti del gruppo del placebo presentava diminuzioni di BAP inferiori al 25%. Questi dati sono ulteriormente riassunti nella tabella che segue. La tabella mostra il numero di soggetti trattati con alendronato e con placebo (e la relativa percentuale) che mostravano diminuzioni di BAP rispetto ai valori iniziali < 25% o > 25% (a 3 e 6 mesi, rispettivamente).

Riepilogo delle variaz. percent. individuali di BAP rispetto ai valori iniziali per soggetti trattati con alendronato 10 mg e placebo
Numero di soggetti/Numero Totale di soggetti

Percentuale BAP Variazione Cutoff	3 Mesi		6 Mesi	
	Placebo N = 148	Alendronato 10 mg N = 74	Placebo N = 148	Alendronato 10 mg N = 74
Diminuzione del 25% o superiore	33/148 (22,3%)	57/74 (77,0%)	36/148 (24,3%)	63/74 (85,1%)
Diminuzione inferiore al 25%	115/148 (77,7%)	17/74 (23,0%)	112/148 (75,7%)	11/74 (14,9%)

Nel gruppo dell'alendronato 10 mg, a un decremento medio di BAP del 45,7% rispetto ai valori iniziali a 6 mesi è seguito un aumento medio di DMO del 7,8% a 24 mesi. Al contrario, la lieve variazione rispetto ai valori iniziali di BAP a 6 mesi per il gruppo del placebo e integrazioni di calcio (-11,3%) è stata accompagnata da un lieve decremento della DMO di -0,8% a 24 mesi.

Variatione percentuale di BAP rispetto ai valori iniziali in soggetti trattati con alendronato 10 mg e placebo



Riepilogando, è stato dimostrato che:

1. Le concentrazioni di BAP riflettono il maggiore rimodellamento osseo associato a carenza di estrogeni in donne postmenopausali apparentemente sane.
2. Le concentrazioni di BAP riflettono variazioni nel rimodellamento osseo che si verificano a seguito di terapia anti-osteoporotica con alendronato in donne postmenopausali.
3. Diminuzioni clinicamente significative di concentrazioni di BAP a 3 e 6 mesi sono indici di variazioni del rimodellamento osseo. Aumenti della DMO a 24 mesi dimostrano l'efficacia della terapia con alendronato 10 mg somministrato a donne postmenopausali osteoporotiche.
4. Una riduzione di BAP di almeno il 25% rispetto ai valori iniziali, misurata con il test Tandem Ostase, può indicare variazioni nel rimodellamento osseo dovute a terapia anti-osteoporotica.

I soggetti sottoposti a terapia anti-osteoporotica con alendronato i cui livelli di BAP non si riducono del 25% rispetto ai valori iniziali nei primi tempi di valutazione devono essere ritestati ai tempi di valutazione successivi. Degli 11 soggetti che avevano registrato un decremento inferiore al 25% dei valori di BAP rispetto ai valori iniziali a 6 mesi, 9 hanno registrato una riduzione di BAP superiore al 25% rispetto ai valori iniziali a 24 mesi. Tutti questi soggetti hanno risposto all'alendronato 10 mg con incrementi della DMO. I soggetti trattati i cui livelli di BAP non diminuiscono del 25% rispetto ai valori iniziali devono essere analizzati con altri mezzi clinici per determinare l'efficacia del trattamento.

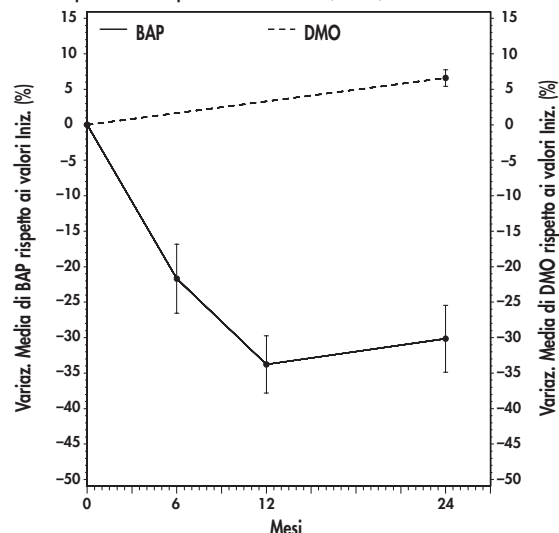
Donne Postmenopausali – Terapia ormonale sostitutiva (HRT)

Oltre allo studio sopra descritto, sono stati eseguiti altri studi al fine di dimostrare la capacità dell'analisi Tandem Ostase di riflettere alterazioni nel rimodellamento osseo in risposta alla terapia con estrogeni (29,32). Di seguito sono presentati i dati di uno di questi studi, nel quale 12 donne postmenopausali sane non isterectomizzate, di età compresa tra 65 e 75 anni, sono state sottoposte a una terapia con estrogeni/progestinici (Premarin 0,625 mg e Provera 2,5 mg) somministrati quotidianamente per due anni. Inoltre, 6 donne sane isterectomizzate hanno ricevuto solo gli estrogeni, per una popolazione totale di studio di 18 soggetti.

L'ALP scheletrico è stato misurato con il test Tandem Ostase all'inizio dello studio e a 6, 12, e 24 mesi, mentre la DMO a livello lombare è stata determinata all'inizio dello studio e a 24 mesi.

Variazioni medie percentuali dall'inizio dello studio e barre di errori standard per BAP (asse delle ordinate a sin.) e per DMO (asse delle ordinate a destra) sono indicate a ciascun tempo di valutazione nel seguente grafico. Nei soggetti trattati con estrogeni si osserva un aumento del 6,6% della DMO a livello lombare rispetto ai valori iniziali, il che indica che la terapia con estrogeni ha un effetto positivo sulle ossa. I risultati presentati nel grafico mostrano anche una riduzione tempo-dipendente delle concentrazioni di BAP per il gruppo trattato, che raggiunge il nadir a 12 mesi. Le riduzioni osservate delle concentrazioni di BAP per il gruppo trattato con estrogeni, misurate con l'analisi Tandem Ostase, sono significativamente differenti rispetto i valori iniziali ($p \leq 0,0001$) a 6 mesi e a tutti i successivi tempi di valutazione (a 12 e 24 mesi).

Dati del gruppo trattato a estrogeni
Variatione media percentuale rispetto ai valori iniziali (± 1 ES) in BAP e DMO lombare vs. Tempo



Le variazioni di BAP e di DMO in questo studio corrispondono alle attuali conoscenze sul rimodellamento osseo e sul meccanismo d'azione delle terapie anti-osteoporotiche (5,33). Da questi risultati si può concludere che la riduzione delle concentrazioni di BAP misurata con il test Tandem Ostase nei soggetti sottoposti a terapia con estrogeni riflette delle variazioni nel turnover osseo dovute alla terapia anti-osteoporotica.

I risultati del test Tandem Ostase devono essere utilizzati esclusivamente insieme ai dati del quadro clinico dei pazienti e di altre procedure diagnostiche.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL METODO

Precisione intra-serie

La precisione intra-serie è stata determinata analizzando quattro pool di sieri contenenti BAP a varie concentrazioni. Ciascun pool è stato analizzato in replicati di 20. Riportiamo di seguito i risultati:

Pool di sieri	1	2	3	4
Numero di Replicati	20	20	20	20
Media $\mu\text{g/L}$	7,4	27,3	52,7	79,5
Deviazione standard	0,48	0,78	1,35	3,54
CV %	6,5	2,9	2,6	4,5

Precisione inter-serie

La precisione inter-serie è stata determinata mediante analisi in duplicato di quattro pool di sieri in una serie di 20 analisi calibrate individualmente.

Pool di sieri	A	B	C	D
Numero di analisi	20	20	20	20
Media $\mu\text{g/L}$	8,4	29,2	55,6	81,1
Deviazione standard	0,47	1,88	2,03	4,92
CV %	5,8	6,4	3,7	6,1

Recupero e Diluizione

Varie quantità di un campione di siero contenente livelli elevati di BAP sono state aggiunte a sieri umani contenenti BAP endogeno; i campioni sono stati quindi analizzati in triplicato.

Correzione $\mu\text{g/L}$	Concentrazione attesa $\mu\text{g/L}$	Concentrazione osservata $\mu\text{g/L}$	% Recupero*
14,0	24,6	24,8	100,9
39,9	50,5	48,8	96,6
59,2	69,8	66,0	94,6
92,2	102,8	92,6	90,1

* La percentuale di recupero è uguale alla concentrazione osservata divisa per la concentrazione attesa e poi moltiplicata per 100.

Un campione di siero contenente una concentrazione elevata di BAP è stato diluito con il calibratore Zero/Diluente e quindi analizzato a diluizioni multiple.

Diluizione $\mu\text{g/L}$	Concentrazione attesa $\mu\text{g/L}$	Concentrazione osservata $\mu\text{g/L}$	% Recupero*
Puro	N/A	54,6	N/A
1:4	27,3	27,9	102,3
1:6	18,2	17,4	95,4
1:8	13,7	12,7	92,8

* La percentuale di recupero è uguale alla concentrazione osservata divisa per la concentrazione attesa e poi moltiplicata per 100.

Sostanze interferenti

- L'**emoglobina**, misurata a concentrazioni fino a 500 mg/dL, non interferisce con il test Ostase BAP.
- La **bilirubina coniugata e non coniugata**, analizzata rispettivamente a concentrazioni fino a 20 mg/dL e 40 mg/dL, non interferisce con il test Ostase BAP.
- I **trigliceridi**, testati a concentrazioni fino a 2000 mg/dL, non interferiscono con il test Ostase BAP.
- Le **proteine totali**, testate a concentrazioni comprese fra 3 e 14 g/dL, non interferiscono con il test Ostase BAP.
- 100 U/L di ALP intestinale danno un risultato di 1,0 µg/L nel test Ostase BAP.
- 100 U/L di ALP placentare non hanno prodotto risultati rilevabili nel test Ostase BAP.

Reattività della ALP epatica

La reattività della ALP epatica misurata con il test Ostase BAP è stata determinata mediante campioni di siero provenienti da pazienti affetti da epatopatie e campioni di siero di pazienti affetti da morbo di Paget. I campioni sono stati quindi sottoposti a screening mediante elettroforesi e sono risultati contenere concentrazioni di ALP epatica o BAP > 95%.

Per valutare la reattività della ALP epatica sono stati utilizzati due metodi. Il primo, descritto da Moss e Whitby (35), utilizza il metodo della inattivazione al calore che riduce al minimo l'apporto di BAP endogeno nel campione con ALP epatica elevata. Con questo metodo, 100 U/L di attività di ALP epatica hanno prodotto un risultato da 2,8 a 3,4 µg/L nel test Ostase BAP.

La seconda procedura, descritta da Price, et al. (36), utilizza il metodo della pendenza (test Ostase BAP vs. ALP totale), in cui non si è effettuato alcun pretrattamento dei campioni. In questo studio effettuato con il test Ostase BAP, la determinazione quantitativa di ALP epatica e BAP nei campioni è stata tracciata sull'asse delle ordinate, mentre l'attività di ALP totale è stata tracciata sull'asse delle ascisse per ciascun campione. Dai valori di pendenza dei campioni di ALP epatica e BAP, è risultato che:

- 100 U/L di attività di ALP epatica hanno prodotto un risultato di 6,2 µg/L nel test Ostase BAP; e
- 100 U/L di attività di BAP hanno dato un risultato di 36,9 µg/L nel test Ostase BAP.

Interferenza di farmaci

A tre pool di sieri distinti contenenti BAP sono stati aggiunti farmaci a varie concentrazioni e i pool sono quindi stati analizzati in quadruplicato. I farmaci e le concentrazioni più elevate sono elencati di seguito. L'analisi è stata condotta secondo le linee guida EP-7P relative alle interferenze dei farmaci nelle analisi cliniche, stabilite dall'NCCLS.

acetaminofene	20 mg/dL
alendronato	5 mg/dL
aspirina	50 mg/dL
calcitonina salmone	112 IU/dL
calcio	20 mg/dL
estrogeni	400 ng/dL
etidronato	105 mg/dL
ibuprofene	40 mg/dL
pamidronato	18 mg/dL
progesterone	25 mg/dL
vitamina D	80,500 IU/dL

Tali farmaci non hanno mostrato interferenze con il recupero del BAP dai pool di sieri nel test condotto con Ostase BAP.

Concentrazione minima rilevabile

La concentrazione minima rilevabile di BAP nel test Ostase BAP è stimata pari a 0,7 µg di BAP/L. Per concentrazione minima rilevabile si intende la concentrazione di BAP corrispondente all'assorbanza che è di due deviazioni standard superiore all'assorbanza media di venti determinazioni in replicato del Calibratore Zero/Diluyente.









L'acquisto del presente kit ne autorizza l'uso in base ai brevetti USA N. 4,376,110 e 4,486,530.

Tandem® e Ostase® sono marchi registrati della Hybritech Incorporated, filiale della Beckman Coulter, Inc.

*Tween è un marchio della ICI Americas, Inc.

REFERENCES/BIBLIOGRAPHIE/LITERATUR

1. Riggs L. Causes of age-related bone loss and fractures, Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment. Deluca HF and Mazess R, eds., Elsevier (New York), pp. 7-16, 1990.
2. Status of Research in Osteoporosis. Osteoporosis Research, Education and Health Promotion. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
3. Canalis E. Regulation of bone remodeling, Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Favus MJ, ed., Raven Press (New York), pp. 33-37, 1993.
4. Kleerekoper M and Avioli LV. Evaluation and treatment of postmenopausal osteoporosis, Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Favus MJ, ed., Raven Press (New York), pp. 223-229, 1993.
5. Lindsay R. Osteoporosis. A Guide to Diagnosis, Prevention, and Treatment. Raven Press (New York), pp. 1-39, 1992.
6. Epstein S. Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. *Endocrine Reviews* 9:437-448, 1988.
7. Whyte MP. Alkaline phosphatase and the measurement of bone formation, *Clinical Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. Potts JT and Frame B, eds., pp. 120-125, 1983.
8. Garnero P and Delmas P. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1046-1053, 1993.
9. Cooper EH, Whelan P, and Purves D. Bone alkaline phosphatase and prostate-specific antigen in the monitoring of prostate cancer. *The Prostate* 25:236-242, 1994.
10. Van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, and Sanders GTB. Bone alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta* 201:27-33, 1991.
11. Merkow RL and Lane JM. Metabolic bone disease and Paget's disease in the elderly: II. Paget's Disease. *Clin Rheum Dis* 12:70, 1986.
12. Lindsay R. Sex steroids in the pathogenesis and prevention of osteoporosis, Osteoporosis: Etiology, Diagnosis, and Management. Riggs L and Melton LJ, eds., Raven Press (New York), pp. 333-358, 1988.
13. Peck W. The pathogenesis of postmenopausal osteoporosis, Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment. Deluca HF and Mazess R, eds., Elsevier (New York), pp. 3-6, 1990.
14. Christiansen C. Osteoporosis: Diagnosis and management today. *Bone* 17:513S-516S, 1995.
15. Turner R, Riggs B and Spelsberg T. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Reviews* 15:275-300, 1994.
16. Kanis J. Pathogenesis of osteoporosis and fracture, Osteoporosis. London: Blackwell Science Ltd.; pp. 22-55, 1994.
17. Mack TM and Ross RK. A current perception of HRT risks and benefits, Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment. Deluca HF and Mazess R, eds., Elsevier (New York), pp. 161-178, 1990.
18. Riggs L and Melton LJ. The prevention and treatment of osteoporosis. *N Engl J Med* 327:620-627, 1992.
19. Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Prevention or Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products, Food and Drug Administration. April, 1994.
20. Ribot C, Tremolieres F and Pouilles JM. Prevention of postmenopausal bone loss by long-term parenteral administration of 17 β estradiol: comparison of percutaneous and transdermal route, Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment. Deluca HF and Mazess R, eds., Elsevier (New York), pp. 137-145, 1990.
21. Delmas P. Biochemical markers of bone turnover. Methodology and clinical use in osteoporosis. *Am J Med* 91:595-635, 1991.
22. Duda RJ, O'Brien JF, Katzman JA, Peterson JM, Mann KG, and Riggs BL. Concurrent assays of circulating bone gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age, and metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 66:951-957, 1988.
23. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. 3rd edition. May 1993. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Washington, DC: US Government Printing Office, 1993.
24. Manual Guide - Safety Management No. CDC-22. Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts. April 30, 1976. Atlanta, GA: Centers for Disease Control.
25. Hill CS and Wolfert RL. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase. *Clin Chim Acta* 186:315-320, 1989.
26. Garnero P, Shih WJ, Gineyts E, Karpf DB, and Delmas PD. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1693-1700, 1994.
27. Liberman UA, Weiss SR, Broll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW, Dequeker J, Favus M, Seeman E, Recker RR, Capizzzi T, Santora AC, Lombardi A, Shah RV, Hirsch LJ and Karpf DB. For the Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 333:1437-1443, 1995.
28. Dawson-Hughes B, Dallal GE, Krall EA, Sadowski L, Sahyoun N and Tannenbaum S. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *N Engl J Med* 323:878-883, 1990.
29. Reid IR, Ames RW, Evans MC, Gamble GD, and Sharpe SJ. Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Am J Med* 98:331-335, 1995.
30. Devogelaer JP, Broll H, Correa-Rotter R, Cumming DC, De Deuxchaisnes CN, Geusens P, Hosking D, Jaeger P, Kaufman JM, Leite M, Leon J, Liberman U, Menkes CJ, Meunier PJ, Reid I, Rodriguez J, Romanowicz A, Seeman E, Vermeulen A, Hirsch LJ, Lombardi A, Plezia K, Santora AC, Yates AJ and Yuan W. Oral alendronate induces progressive increases in bone mass of the spine, hip, and total body over 3 years in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 18:141-150, 1996.
31. Overgaard K, Alexandersen P, Riis BJ and Christiansen C. Evaluation of a new commercial IRMA for bone-specific alkaline phosphatase during treatment with hormone replacement therapy and calcitonin. *Clin Chem* 42:973-974, 1996.
32. Soletormos G, Schioler V, Nielsen D, Skovsgaard T, and Dombrowsky P. Interpretation of results for tumor markers on the basis of analytical imprecision and biological variation. *Clin Chem* 10:2077-2083, 1993.
33. Blumsohn A, Hannon RA, Al-Dehaimi AW, and Eastell R. Short-term intraindividual variability of markers of bone turnover in healthy adults. *J Bone Min Res* 9:513, 1994.
34. Raisz L, Wiita B, Artis A, Bowen A, Schwartz S, Trahiotis M, Shoukri K and Smith J. Comparison of the effects of estrogen alone and estrogen plus androgen on biochemical markers of bone formation and resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 81:37-43, 1996.
35. Kanis J. Treatment of generalized osteoporosis with inhibitors of bone resorption, Osteoporosis. London: Blackwell Science Ltd.; pp. 168-195, 1994.
36. Kennedy J, Carey R, Coolen R, Garber C, Hartman A, Lee H, Leitz V, Levine J, McLean M, Osberg I, Steindel S, and Sylvester E. User Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Tentative Guideline, NCCLS 4:8 EP5-T2, 1984.
37. Moss D and Whitby L. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chem Acta* 61:63, 1975.
38. Price C, Mitchell C, Moriarty J, Gray M and Noonan K. Mass versus activity of an immunometric assay for bone alkaline phosphatase in serum. *Ann Clin Biochem* 32:405, 1995.

 EXP	GB <i>Use By</i> DE <i>Verwendbar bis</i> ES <i>Fecha de caducidad</i> IT <i>Utilizzare entro</i> FR <i>Utiliser jusqu'e</i> NL <i>Houdbaar tot</i> DK <i>Holdbar til</i> CZ <i>Použitelné do</i> SK <i>Použitelné do</i> GR <i>Ημερομηνία λήξης</i> PT <i>Prazo de validade</i> HU <i>Felhasználható</i> SE <i>Använd före</i> PL <i>Użyć przed</i>		GB <i>Batch code</i> DE <i>Chargenbezeichnung</i> ES <i>Código de lote</i> IT <i>Codice del lotto</i> FR <i>Code du lot</i> NL <i>Lot nummer</i> DK <i>Lotnummer</i> CZ <i>Číslo šarže</i> SK <i>Číslo šarže</i> GR <i>Αριθμός Παρτίδας</i> PT <i>Código do lote</i> HU <i>Sarzszzám</i> SE <i>Lot nummer</i> PL <i>Kod partii</i>
	GB <i>Catalogue number</i> DE <i>Bestellnummer</i> ES <i>Número de catálogo</i> IT <i>Numero di catalogo</i> FR <i>Référence du catalogue</i> NL <i>Catalogus nummer</i> DK <i>Katalognummer</i> CZ <i>Katalogové číslo</i> SK <i>Katalógové číslo</i> GR <i>Αριθμός καταλόγου</i> PT <i>Referência de catálogo</i> HU <i>Katalógusszám</i> SE <i>Katalognummer</i> PL <i>Numer katalogowy</i>		GB <i>Manufacturer</i> DE <i>Hersteller</i> ES <i>Fabricante</i> IT <i>Fabbricante</i> FR <i>Fabricant</i> NL <i>Fabrikant</i> DK <i>Producent</i> CZ <i>Výrobce</i> SK <i>Výrobca</i> GR <i>Κατασκευαστής</i> PT <i>Fabricante</i> HU <i>Gyártó</i> SE <i>Tillverkare</i> PL <i>Producent</i>
	GB <i>Contains sufficient for <n> tests</i> DE <i>Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen</i> ES <i>Contenido suficiente para <n> ensayos</i> IT <i>Contenuto sufficiente per <n> saggi</i> FR <i>Contenu suffisant pour <n> tests</i> NL <i>Inhoud voldoende voor <n> testen</i> DK <i>Indeholder tilstrækkeligt til <n> test</i> CZ <i>Lze použít pro <n> testů</i> SK <i>Obsah postačuje na <n> stanovení</i> GR <i>Περιεχόμενο επαρκές για «ν» εξετάσεις</i> PT <i>Conteúdo suficiente para <n> ensaios</i> HU <i>A doboz tartalma <n> vizsgálat elvégzéséhez elegendő</i> SE <i>Räcker till <n> antal tester</i> PL <i>Wystarczy na wykonanie <n> testów</i>		GB <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i> DE <i>In-Vitro-Diagnostikum</i> ES <i>Producto sanitario para diagnóstico in vitro</i> IT <i>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</i> FR <i>Dispositif médical de diagnostic in vitro</i> NL <i>Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek</i> DK <i>Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik</i> CZ <i>In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek</i> SK <i>Zdravotnícka pomocka in vitro</i> GR <i>Ιn Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν</i> PT <i>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro</i> HU <i>In vitro diagnosztikum</i> SE <i>Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik</i> PL <i>Wyrób do diagnostyki In Vitro</i>
	GB <i>Temperature limitation</i> DE <i>Temperaturbegrenzung</i> ES <i>Límite de temperatura</i> IT <i>Limiti di temperatura</i> FR <i>Limites de température</i> NL <i>Temperatuurlimiet</i> DK <i>Temperaturbegrænsning</i> CZ <i>Teplotní rozmezí od do</i> SK <i>Teplotné rozmedzie od do</i> GR <i>Περιορισμοί θερμοκρασίας</i> PT <i>Limites de temperatura</i> HU <i>Hőmérséklettartomány</i> SE <i>Temperaturbegränsning</i> PL <i>Przestrzeżać zakresu temperatury</i>		GB <i>Consult Instructions for Use</i> DE <i>Gebrauchsanweisung beachten</i> ES <i>Consulte las instrucciones de uso</i> IT <i>Consultare le istruzioni per l'uso</i> FR <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> NL <i>Raadpleeg de gebruiksaanwijzing</i> DK <i>Se brugsanvisning</i> CZ <i>Viz návod k použití</i> SK <i>Vid' návod na použitie</i> GR <i>Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης</i> PT <i>Consulte as instruções de utilização</i> HU <i>Nézze meg a Használati utasítást</i> SE <i>Se handhavandebeskrivningen</i> PL <i>Sprawdź w instrukcji obsługi</i>

 Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd).

UK Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd), 10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD
Tel: +44 (0) 191 519 0660 • Fax: +44 (0) 191 519 0760 • e-mail: marketing@idsltd.com • www.idsltd.com

USA Immunodiagnostic Systems Inc (IDS Inc.), P.O. Box 17063, Fountain Hills, AZ 85269-7063
Tel: 480-836-7435 • Fax: 480-836-7437 • e-mail: info@idsinc.us.com • www.idsinc.us.com

Germany Immunodiagnostic Systems GmbH (IDS GmbH), Mainzer Landstrasse 49, 60329 Frankfurt am Main
Tel: +49 (0) 69 3085-5025 • Fax: +49 (0) 69 3085-5100 • e-mail: info@ids-de.com • www.ids-de.com

France Immunodiagnostic Systems EURL (IDS EURL), 116 avenue du General Leclerc, 75014 Paris
Tel: +33 (0)1 56 53 39 32 • Fax: +33 (0)1 56 53 93 31 • e-mail: info@ids-eurl.com • www.ids-eurl.com