

Enzym-Immunoassay zur Quantifizierung knochenspezifischer alkalischer Phosphatase (BAP) in Humanserum

### MicroVue™ BAP EIA Zusammenfassung

#### Vorbereitung von Reagenzien und Proben

- ☐ Verdünnt 10fach Konzentrierte Waschpuffer 1:10 mit vollentsalztem Wasser.

#### Testverfahren

Je 125 µl Testpufferlösung in die Testvertiefungen geben

Je 20 µl Standardlösungen, Kontrollen und Proben in die Testvertiefungen geben (Die Teststreifen vorsichtig schwenken, um eine gründliche Mischung von Probe und Pufferlösung zu erreichen.)

Bei 20 – 28 °C 3 Stunden ± 10 Minuten inkubieren

4 Wäschezyklen mit Waschpuffer

- ☐ Bereiten Sie Substratlösung (30 – 60 min vor gebrauch) In jede benötigte Substratpufferflasche eine Substratplatte geben (erschütterung kräftig)

Je 150 µl Substratlösung

Bei 20 – 28°C 30 ± 5 Minuten inkubieren

Je 100 µl Stopplösung

Optische Dichte bei 405 nm ablesen. Analysieren sie die probe resultate mit einem quadratischen kurve sitz.  
 $y = A + Bx + Cx^2$

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN

Bei der skelett- oder knochenspezifischen Isoform der alkalischen Phosphatase handelt es sich um ein tetramerisches Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche von Osteoblasten zu finden ist.<sup>1</sup> Osteoblasten sind Zellen, die für die Bildung neuer Knochenmatrix und deren Mineralisation verantwortlich sind. Zwar ist der Funktionsmechanismus von BAP noch nicht vollständig bekannt, das Mitwirken dieser Substanz bei der Skelettmineralisation ist jedoch bereits nachgewiesen.<sup>1,2,3</sup>

Knochen unterliegen einem als Knochengeweberemodellierung bezeichneten Stoffwechsellvorgang.<sup>3,4</sup> Dazu gehören ein Abbauvorgang – eine durch Osteoklasten bewirkte Knochenresorption – und ein Aufbauvorgang, die durch Osteoblasten bewirkte Knochenformation.<sup>3,4</sup> Die Remodellierung ist zum Erhalt der Gesamtintegrität des Knochens erforderlich und beruht auf einer genau abgestimmten Kopplung, d.h. Resorptions- und Formationsvorgänge stehen in einem Gleichgewicht zueinander.<sup>3,4</sup> Bei einer Störung des Knochenstoffwechsels tritt dieser Prozess aus dem Gleichgewichtszustand heraus, so dass es bei einem Übergewicht an Resorption gegenüber Formationsvorgängen zu einem Gesamtverlust an Knochenmatrix kommt.<sup>3,4</sup> Dies wiederum kann zur Osteoporose<sup>3,4</sup> oder zu den im Rahmen der Paget-Krankheit auftretenden Veränderungen des Knochengewebes führen.<sup>5</sup> Durch die Bestimmung spezifischer biochemischer Marker dieser Remodellierungsprozesse kann die Geschwindigkeit bzw. der Umsatz (engl. „turnover“) des Stoffwechsels ermittelt werden.<sup>3,4</sup>

Osteoporose ist eine Knochenstoffwechselkrankheit, die durch Störungen der Knochengeweberemodellierung charakterisiert ist. Es ist eine systemische Skeletterkrankung, die von einer geringen Knochenmasse und einem mikrostrukturellen Abbau des Knochengewebes begleitet ist und somit zu einer erhöhten Frakturanfälligkeit führt.<sup>6</sup> Der häufigste Typ der Osteoporose tritt bei postmenopausalen Frauen auf und wird von einem auf dem Ausbleiben der Ovarialfunktion beruhenden Östrogenmangel verursacht.<sup>3</sup> Durch die Wiederherstellung der prämenopausalen Östrogenkonzentration mittels Substitutionstherapien kann ein Abbau des Knochengewebes und Osteoporose verhindert werden.<sup>3,6</sup> Auf Östrogenen und den sog. Bisphosphonaten beruhende antiresorptive Therapien können zur Vermeidung von Knochenschwund oder zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt werden.<sup>3,6,7</sup>

### VERWENDUNGSZWECK

Der MicroVue BAP Immunassay ermöglicht die quantitative Bestimmung der knochenspezifischen alkalischen Phosphataseaktivität (BAP) in Serum, ein Indikator der Osteoblastenaktivität. Die BAP-Messung soll folgende Vorgänge unterstützen:

- Behandlung von Patienten mit postmenopausaler Osteoporose und Paget-Krankheit
- Überwachung postmenopausaler Patientinnen bei Hormon- oder Bisphosphonattherapien
- Prognose der skelettalen Reaktion auf Hormontherapien bei postmenopausalen Patientinnen

Zudem kann Osteoporose ein Resultat einer inadäquaten maximalen Knochenmasse während der Wachstumsperiode sein – einem altersbedingten Ungleichgewicht der Knochengeweberemodellierung, bei dem die Resorption übermäßig stark ausgeprägt ist – und durch eine Reihe klinischer Erkrankungen und Therapien verursacht worden sein, die zu Knochenschwund oder Störungen der Knochengeweberemodellierung führen.<sup>3</sup> Dazu gehören endokrine Erkrankungen wie z. B. Hypogonadismus, Hyperthyreoidismus, Hyperparathyreoidismus, Hyperkortisolismus, renales Versagen, Knochenmetastasen, ernährungsbedingte und auf dem Mineralstoffwechsel beruhende Gastrointestinalerkrankungen, Bindegewebskrankheiten, multiple Myelome, chronische Immobilisation, Alkoholismus, Tabakmissbrauch sowie chronische Heparin- und Kortikosteroidtherapien.<sup>3</sup>

Die Paget-Krankheit der Knochen ist eine fokale Störung, die bei symptomatischen Patienten zu Schmerzen und Skelettdeformierungen führt.<sup>5</sup> Die im Rahmen der Paget-Krankheit auftretenden Veränderungen des Knochengewebes zeichnen sich durch eine höchst anomal strukturierte Knochenmatrix aus, deren Anomalität durch eine übermäßig hohe Remodellierungsaktivität verursacht wird. Die Läsionen treten hauptsächlich in Schädel, Wirbelsäule, Becken und den langen Knochen auf und können zu Frakturen und neurologischen Störungen führen.<sup>5</sup> Die Ätiologie der Paget-Krankheit ist zwar unbekannt, es werden jedoch genetische und virale Faktoren verantwortlich gemacht.<sup>5</sup> Eine Senkung der hohen biochemischen Aktivität auf ein normales Niveau wird zur Zeit mit Hilfe von Bisphosphonaten und Calcitonin erreicht, wodurch eine normale Knochenstruktur wiederhergestellt werden kann.<sup>9</sup>

Als quantitativer Marker für den Knochenumsatz bietet BAP bei Osteoporose und Paget-Krankheit und bei Veränderungen der Krankheitsaktivität infolge antiresorptiver Therapien wichtige Informationen zur Knochengeweberemodellierung.<sup>10-12</sup> Für den MicroVue BAP Assay wurde mit Hilfe der Antikörpertechnologie ein monoklonaler Antikörper mit einer hohen BAP-Spezifität entwickelt.<sup>10</sup> Diese Spezifität des monoklonalen Antikörpers ermöglicht es, die BAP-Aktivität in Serum auf einfache, bequeme, reproduzierbare und direkte Weise zu bestimmen.

## FUNKTIONSPRINZIP

MicroVue BAP ist ein auf Mikrotiterstreifen beruhender Immunassay, bei dem die in der Probe vorliegende BAP an die mit einem monoklonalen Anti-BAP-Antikörper beschichteten Mikrotiterstreifen gebunden wird. Die Enzymaktivität des gebundenen BAP wird mit Hilfe eines pNPP-Substrats bestimmt.

## MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

### 96 Tests auf knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP)

Der MicroVue BAP Enzym-Immunassay enthält folgende Komponenten:

### A BAP-Standardlösungen A - F

**B** Artikelnr. 4395 bis 4400 je 0,4 ml

**C** (A = 0, B = 2, C = 20, D = 50, E = 80, F = 140 E/l BAP)

**D** Von Osteosarkomzellen (SAOS-2) hergestelltes BAP in Pufferlösung mit Magnesiumchlorid, Zinksulfat, Tensid,

**E** Trägerprotein, blauem Farbstoff und Natriumazid (0,05 %) als

**F** Konservierungsmittel

### L Niedrige/hohe Kontrolle

**H** Artikelnr. 4401, 4402 je 0,4 ml

Von Osteosarkomzellen (SAOS-2) hergestelltes BAP in Pufferlösung mit Magnesiumchlorid, Zinksulfat, Tensid, Trägerprotein, blauem Farbstoff und Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel

### 1 Beschichtete Teststreifen

Artikelnr. 4660 je 12

Gereinigter monoklonaler Anti-BAP-IgG-Antikörper von Mäusen absorbiert auf die Vertiefungen der Teststreifen

### 2 Stopplösung

Artikelnr. 4702 15 ml

0.5N NaOH

### 3 10fach konzentrierter Waschpuffer

Artikelnr. 4703 55 ml

Nicht ionisches Detergens in Pufferlösung mit Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel

### 4 Testpufferlösung

Artikelnr. 4403 27 ml

Gepufferte Lösung mit Magnesiumchlorid, Zinksulfat, Tensid und Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel

### 5 Substratpuffer

Artikelnr. 4404 3 x 10 ml

2-Amino-2-methyl-1-propanol-Lösung mit HEDTA, Magnesiumchlorid, Zinksulfat und Natriumazid (0,05 %) als Konservierungsmittel

### 6 Substrattabletten

Artikelnr. 0012 3 x 20 mg

p-Nitrophenylphosphat

## BENÖTIGTE MATERIALIEN (NICHT IM LIEFERUMFANG)

- Mikropipetten zum Pipettieren von 20 µl und 100-300 µl
- Geräte zum Abmessen von Flüssigkeiten im Volumenbereich von 100 bis 300 ml
- Behälter für die Waschpufferverdünnung
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Plattenlesegerät für Absorbanzmessungen von  $A_{405} > 2,0$
- Software zum Anpassen quadratischer Kalibrierkurven

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Zur *In-vitro*-Diagnostik
2. Proben als potenziell gefährliches biologisches Material behandeln. Beim Arbeiten mit diesem Kit und den Proben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
3. Behälter und ungenutzte Inhaltsstoffe gemäß den Anforderungen bundesweit, landesweit und örtlich geltender Bestimmungen entsorgen.
4. Die mitgelieferten Reagenzien als eine zusammengehörende Einheit vor dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
5. Die Reagenzien des Assays wie angegeben lagern.

6. Die beschichteten Teststreifen nicht verwenden, wenn der Beutel beschädigt ist.
7. Jede Probe mit Duplikaten testen.
8. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen beim Arbeiten mit diesem Kit.
9. 0,5 N NaOH ist ätzend und kann zu schweren Reizungen der Haut. Nicht einnehmen. Berührung mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Bei Berührung mit Wasser abwaschen. Bei Einnahme einen Arzt konsultieren.
10. Natriumazid wird als Konservierungsstoff verwendet. Der unbeabsichtigte Kontakt mit Pufferlösungen, die Natriumazid enthalten, bzw. deren Einnahme kann zu Reizungen der Haut, der Augen oder des Mundes führen. Die Pufferlösungen nur für die vorgesehenen Verwendungszwecke einsetzen und den Kontakt mit Säuren vermeiden. Natriumazid kann beim Kontakt mit Kupfer- und Bleirohren hochexplosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen, um eine Anreicherung von Aziden zu vermeiden.
11. Der Substratpuffer enthält 2-Amino-2-methyl-1-propanol und kann bei anhaltendem Kontakt Reizungen der Augen und/oder der Haut verursachen. Betroffene Bereiche nach dem Kontakt sofort mit Wasser und Seife waschen.
12. Für ein zügiges und effizientes Dosieren von Flüssigkeiten wird der Gebrauch von Mehrkanalpipetten empfohlen.
13. Zum Gewährleisten genauer Messungen bei der Zugabe der Proben und Standardlösungen genau arbeiten. Beim Pipettieren vorsichtig vorgehen und nur kalibrierte Geräte verwenden.
14. Proben mit über 140 E/l mit Testpufferlösung verdünnen und erneut bestimmen. Den Verdünnungsfaktor bei den Berechnungen berücksichtigen.
15. Für dieses Assay kann eine beliebige anerkannte Waschmethode eingesetzt werden.

## VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

**Die Reagenzien und Materialien vor dem Test auf 20-28 °C bringen. Nach der Entnahme der erforderlichen Reagenzien und Materialien die nicht mehr benötigten Komponenten wieder auf 2-8 °C bringen.**

### Beschichtete Teststreifen

Den Teststreifenträger und die benötigte Anzahl beschichteter Teststreifen aus dem Beutel entnehmen (siehe Tabelle unter *TESTVERFAHREN*). Darauf achten, dass der Beutel, sofern er ungenutzte Teststreifen enthält, wieder richtig verschlossen wird.

### Waschpuffer

Das benötigte Volumen des 1fach konzentrierten Waschpuffers (siehe Tabelle) vorbereiten, indem 10fach konzentrierter Waschpuffer im Verhältnis 1:10 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Bei 20-28 °C aufbewahren. Den 1fach konzentrierten Waschpuffer innerhalb von 21 Tage nach dem Ansetzen verwenden.

## Substratlösung

Die Substratlösung 1 Stunde vor Gebrauch ansetzen. In jede benötigte Substratpufferflasche (siehe Tabelle), die auf 20-28 °C gebracht wurde, eine Substrattablette geben. Die Tablette(n) 30-60 Minuten lang auflösen lassen. Die Flasche(n) kräftig schütteln, um eine vollständige Auflösung zu erzielen. Verbleibende Substratlösung nach dem Gebrauch entsorgen.

## LAGERUNG

Das Kit bei 2-8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren. Nicht gebrauchte Reagenzien bei 2-8 °C aufbewahren. Die Reagenzien vor dem Gebrauch auf 20-28 °C bringen. Den 1fach konzentrierten Waschpuffer (10fach verdünnt) bei 20-28 °C aufbewahren.

## ENTNAHME UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Das Serum mit Hilfe einer standardmäßigen Venenpunktion entnehmen. Die Proben sollten ohne Antikoagulanzen aufbewahrt werden, jedoch so, dass keine Hämolysereaktionen auftreten. Das Blut koagulieren lassen und das Serum durch Zentrifugieren trennen. Das Serum kann bei 2-8 °C 5 Tage, bei ≤ -40 °C 12 Monate und bei ≤ -80 °C 36 Monate lang aufbewahrt werden. Die Proben dürfen nicht häufiger als dreimal eingefroren/aufgetaut werden.

Mit Serum, das vom Koagulum entnommen wurde („Off-the-clot“-Serum), im Serum-Trennröhrchen vorliegendes Serum, Na-Heparin-Blutplasma und Li-Heparin-Blutplasma werden weitgehend vergleichbare Ergebnisse erzielt. Plasmaproben sollten nicht mit Komplexbildnern wie EDTA oder Citrat vorbereitet werden.

## TESTVERFAHREN

### Vor der Durchführung des Tests die gesamte Packungsbeilage lesen.

Vor dem Fortfahren die unter *VORBEREITUNG DER REAGENZIEN* gegebenen Informationen einsehen.

### Die Volumina der verschiedenen Reagenzien bestimmen, die für eine bestimmte Anzahl von Teststreifen benötigt werden.

Anz. der Teststreifen	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
Anz. der Proben (Bestimmung in Duplikaten)	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>40</b>
Substrat (Flasche)	1	1	2*	2*
1fach-Waschpuffer (ml)	100	150	200	300

\*Werden mehrere Flaschen oder Fläschchen benötigt, deren Inhalt zusammenschütten und vor dem Gebrauch mischen.

### Inkubation der Proben

1. Den Teststreifenträger und die benötigte Anzahl der beschichteten Teststreifen unmittelbar vor Gebrauch aus dem Beutel entnehmen (siehe Tabelle). Darauf achten, dass der Beutel, sofern er ungenutzte Streifen enthält, wieder richtig verschlossen wird.
2. Die gewünschte Anzahl der beschichteten Teststreifen in den Teststreifenhalter legen. Die Teststreifen beschriften, damit sie nicht vertauscht werden können, sollte der Teststreifenträger unbeabsichtigt entfernt werden.

- 125 µl Testpufferlösung in jede Vertiefung geben.
- 20 µl Standardlösung, Kontrolle oder Probe in jede Vertiefung geben. **Nicht** durch wiederholtes Aufziehen in der Pipette **mischen**. Dieser Schritt sollte innerhalb von 30 Minuten abgeschlossen werden. **Die Teststreifen vorsichtig schwenken, um eine gründliche Mischung von Probe und Pufferlösung zu erreichen.**
- Bei 20–28 °C 3 Stunden (± 10 Minuten) inkubieren.
- Die Substratlösung innerhalb 1 Stunde vor dem Gebrauch ansetzen. In jede benötigte Substratpufferflasche (siehe Tabelle), die auf 20–28 °C gebracht wurde, eine Substrat-tablette geben. Die Tablette(n) 30–60 Minuten auflösen lassen. Die Flasche(n) kräftig schütteln, um eine vollständige Auflösung zu erzielen.

### Waschen

- Das benötigte Volumen des 1fach konzentrierten Waschpuffers (siehe Tabelle) vorbereiten, indem 10fach konzentrierter Waschpuffer im Verhältnis 1:10 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Bei 20–28 °C aufbewahren. Den 1fach konzentrierten Waschpuffer innerhalb von 21 Tage nach dem Ansetzen verwenden.
- Die Teststreifen manuell umdrehen/entleeren. Mindestens 250 µl des 1fach konzentrierten Waschpuffers in jede Vertiefung geben und die Teststreifen manuell umdrehen/entleeren. Diesen Vorgang dreimal wiederholen, um insgesamt viermal zu waschen. Die Teststreifen nach dem letzten Waschschrift durch kräftiges Ausschlagen auf ein Papierhandtuch trocknen.

### Inkubieren des Substrats

- 150 µl der Substratlösung in jede Vertiefung geben. Verbleibende Substratlösung nach dem Gebrauch entsorgen.
- Bei 20–28 °C 30 Minuten (± 5 Minuten) inkubieren.

### Hinzugeben der Stopplösung und Ablesen des Ergebnisses

- 100 µl der Stopplösung in jede Vertiefung geben. Die Zugabe der Stopplösung sollte auf die gleiche Weise und mit dem gleichen zeitlichen Ablauf erfolgen wie die Zugabe der Substratlösung.
- Die Absorbanz bei 405 nm ablesen. Darauf achten, dass sich in den Vertiefungen keine größeren Blasen befinden und dass die Unterseite der Teststreifen sauber ist. Die Ergebnisse sollten innerhalb von **15 Minuten** nach der Zugabe der Stopplösung abgelesen werden.
- Zum Analysieren des MicroVue BAP Testergebnisses **muss** eine Quantifizierungssoftware zum Anpassen quadratischer Kalibrierkurven verwendet werden.  
Gleichung:  $y = A + Bx + Cx^2$

## QUALITÄTSKONTROLLE

Das diesem Kit beiliegende Analysezertifikat ist nicht spezifischer Natur und soll nachweisen, dass die von Ihrem Labor ermittelten Ergebnisse denen von Quidel entsprechen. Die gegebenen Absorbanzwerte sollen lediglich als Richtwerte dienen. Die von Ihrem Labor erhaltenen Ergebnisse können davon abweichen.

Die im Rahmen der Qualitätskontrolle zu verwendenden Bereiche sind angegeben. Die Kontrollwerte haben die Aufgabe, die Gültigkeit der Kurve und der Proben-ergebnisse zu bestätigen. Jedes Labor sollte eigene Kriterien festlegen, nach denen die Testergebnisse anzunehmen sind. Wenn die Kontrollwerte nicht innerhalb der zulässigen Grenzwerte Ihres Labors liegen, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben wiederholt werden.

Wenn die Absorbanz der MicroVue BAP Standardlösung F unter 1,0 liegt, sollten die Testergebnisse in Frage gestellt und die Proben wiederholt werden.

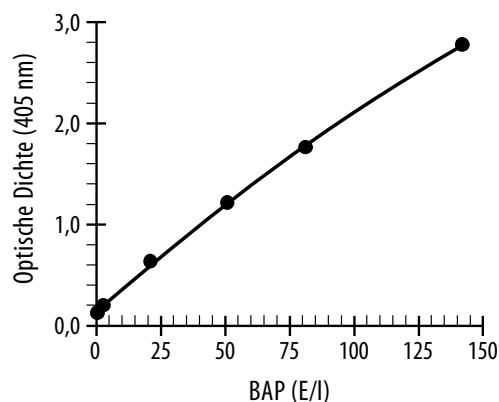
## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Probenergebnisse können in E/l angegeben werden und müssen **nicht** mit dem Verdünnungsfaktor korrigiert werden (es sei denn, die Probe wurde vor dem Test verdünnt).

Eine Einheit (E) des MicroVue Assays entspricht 1 µmol pNPP, hydrolysiert bei 25 °C pro Minute in 2-Amino-2-methyl-1-propanol-Pufferlösung.

### Repräsentative Standardkurve

BAP-Konzentration der Standardlösungen: 0, 2, 20, 50, 80, 140 E/l



## GRENZEN DER METHODE

### HAMA-Interferenzen

Einige Patienten haben Antikörper gegen Mausantikörper (HAMA), die sich bei Immunassays, die aus Maus-Antikörpern hergestellt wurden, störend auswirken können. Besonders bei Serumproben von Patienten, die mit therapeutischen oder diagnostischen Verfahren unter Verwendung von Infusionen mit monoklonalen Maus-Antikörpern behandelt wurden, wurden falsche Ergebnisse beobachtet. Die Ergebnisse des MicroVue BAP Assays sollten für derartige Patienten nur im Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren und mit anderen klinischen Daten des Patienten verwendet werden.

Bei Proben mit signifikant erhöhter alkalischer Leber-Phosphatase-Aktivität können mit dem MicroVue BAP Assay ungewöhnlich hohe Ergebnisse erhalten werden.

Patienten mit Paget-Krankheit, bei denen die Krankheit nicht sehr stark ausgeprägt ist, können BAP-Konzentrationen aufweisen, die noch innerhalb des Referenzbereichs des MicroVue BAP Assays liegen.

## REFERENZBEREICHE

Die BAP-Referenzbereiche wurden für normale Männer im Alter über 25 Jahren (n = 126), normale prämenopausale Frauen im Alter zwischen 25 und 44 Jahren (n = 178) und normale postmenopausale Frauen (n = 107) ermittelt. Für die Bestimmung der Referenzbereiche wurden normale Probanden wie folgt definiert:

- Grundsätzlich gesund, ohne endokrine oder chronische Erkrankungen bzw. Knochenerkrankungen
- Regelmäßiger Menstruationszyklus (prämenopausale Frauen)
- Keine schwangeren oder stillenden (Frauen)
- Keine Medikationen, von denen bekannt ist, dass sie den Knochenstoffwechsel beeinflussen

Beeinflusst werden die Werte durch Faktoren wie geringe Östrogenproduktion, geringe Kalziumaufnahme oder geringe physische Aktivität.<sup>8</sup> Ein bei postmenopausalen Frauen auftretender Östrogenmangel kann zu einem erhöhten Knochenumsatz führen.<sup>3,4</sup> Jedes Labor sollte eigene Referenzbereiche für normale Patienten festlegen. Die Bereiche sollten in Form von nicht parametrischen Referenzintervallen (90 % KI) angegeben werden.

	Alter (Jahre)	Bereich (E/l)	Median	
Frauen	25 - 44	Prämenopausal	11,6 – 29,6	18,3
Frauen	≥ 45	Postmenopausal	14,2 – 42,7	25,0
Männer	≥ 25		15,0 – 41,3	23,2

## LEISTUNGSMERKMALE

### Antikörper-Spezifikationen

Der BAP-Antikörper ist gegenüber der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase-Isoform selektiv und hochaffin, zeigt eine geringe Kreuzaktivität zur hepatischen Form der alkalischen Phosphatase und weist gegenüber intestinalen und plazentaren Isoenzymen eine vernachlässigbare Bindungsaffinität auf.

AP Isoenzym	% Reaktivität
Knochen	100
Leber	3 – 8
Plazenta	0
Darm	0,4

### Sensitivität

Das Nachweisgrenze des MicroVue BAP Assays beträgt 0,7 E/l und wurde im Rahmen einer Nullstandard-Präzisionsstudie an der 3fachen Standardabweichung festgelegt.

## Wiedergewinnung – maximale Wiedergewinnung

Die maximale Wiedergewinnung (engl. „spike recovery“) wurde dadurch ermittelt, dass eine bekannte Menge gereinigter BAP zu Serumproben mit unterschiedlichen Konzentrationen endogener BAP hinzugegeben wurde. Im Folgenden sind typische Ergebnisse aufgeführt, die nach der Zugabe von geringen, mittleren und hohen BAP-Konzentrationen zu Serumproben und anschließender Bestimmung von Triplikaten erhalten wurden.

Endogen (E/l)	Zugabe (E/l)	Gefunden (E/l)	Wiedergew. (%)
13,4	15,7	29,1	99
17,6	37,5	55,3	99
27,2	57,2	88,1	106

## Wiedergewinnung – Linearität

Die Linearität wurde ermittelt, indem eine serielle Verdünnungsreihe der Proben erstellt wurde und die gemessenen Werte mit den erwarteten Werten verglichen wurden. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Probe	Verdünnung	Gefunden (E/l)	Erwartet (E/l)	Wiedergew. (%)
1	unverdünnt	108,5	-	-
	1:2	51,1	54,2	94
	1:4	25,8	27,1	99
	1:6	18,0	18,1	99
2	unverdünnt	39,1	-	-
	1:2	20,1	19,5	103
	1:4	10,3	9,8	105
	1:6	6,7	6,5	103
3	unverdünnt	58,4	-	-
	1:2	29,9	29,2	102
	1:4	15,7	14,6	108
	1:6	9,7	9,7	100

## Präzision

Die Präzision „in der Serie“ wurde für ≥ 21 Replikate von 3 Proben auf 3 Plättchen von 3 verschiedenen Kitchargen (insgesamt 9 Plättchen) ermittelt. Die Präzision „von Serie zu Serie“ wurde durch die Bestimmung von 3 Proben auf 6 einzelnen Plättchen von 3 verschiedenen Kitchargen (insgesamt 18 Plättchen) ermittelt. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

BAP (E/l)	In der Serie <sup>1</sup> (CV %)	Von Serie zu Serie <sup>2</sup> (CV %)
12	5,8	5,2
35	3,9	7,6
100	5,2	5,0

<sup>1</sup> n=21

<sup>2</sup> n=6 Serien

## Störsubstanzen

Die folgenden Substanzen wurden mit den angegebenen Konzentrationen getestet. Sie stellen keine Störungen für diesen Assay dar.

Substanz	Konzentration
Hämoglobin	500 mg/dl
Bilirubin	25 mg/dl
Triglyceride	1420 mg/dl
Gesamteiweiß	6,0 g/dl †
Gesamteiweiß	15,6 g/dl †
Gesamteiweiß	6,0 g/dl ‡
Gesamteiweiß	15,6 g/dl ‡

† Eiweiß mit Wasser

‡ Eiweiß mit BAP (BAP-Konzentration= 43,6 E/l)

## Arzneimittelinterferenzen

Zu den drei Serumproben mit ungefähr 35, 70 und 105 E/l BAP wurden verschiedene Konzentrationen von Arzneimitteln hinzugegeben. Danach wurden sie als Triplicate getestet. Folgende Arzneimittel und Maximalkonzentrationen wurden untersucht:

Substanz	Maximal-konzentration
Etidronate	350 µg/ml
Östrogen	100 µg/ml
Ibuprofen	150 µg/ml
Acetaminophen	350 µg/ml
Aspirin	350 µg/ml
Calcitonin - Human	80 µg/ml
Calcitonin - Lachs	80 µg/ml
Kalzium	500 µg/ml
Norethisteron-Äthinylöstradiol-Mischung (orales Kontrazeptivum)	3 mg/ml
Vitamin D	400 IU/ml

## Genauigkeit

Zur Bewertung der Korrelation zwischen den BAP-Bestimmungen in Serum, die mit dem MicroVue BAP Assay durchgeführt wurden, und den Ergebnissen von drei anderen im Handel erhältlichen Tests zur Bestimmung der alkalischen Gesamphosphatase (TAP) oder BAP wurden Vergleichsstudien durchgeführt. Diese Studien wurden an einem unabhängigen klinischen Forschungszentrum durchgeführt und umfassten Serumproben von 114 Patienten mit der Paget-Krankheit und 464 gesunden Probanden. In der ersten Vergleichsstudie wurde die TAP-Konzentration mit einer kolorimetrischen Methode bestimmt. Der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) zwischen dieser kolorimetrischen Methode und dem MicroVue BAP Assay betrug 0,99. Der zweite Vergleich bestand in einer Elektrophoresebestimmung der BAP-Isoenzym-Konzentrationen ( $r = 0,99$ ). In einem dritten Vergleich wurde die BAP-Konzentration mit einem Radioimmunoassay bestimmt ( $r = 0,99$ ). Von den 114 Patienten mit diagnostizierter Paget-Krankheit lagen die Werte bei 101 Patienten über dem oberen Grenzwert der Referenzbereiche, die für das MicroVue BAP Assay festgelegt wurden. Bei 13 Patienten lagen die Werte unter dem oberen Grenzwert der Referenzbereiche.

## KLINISCHE STUDIEN

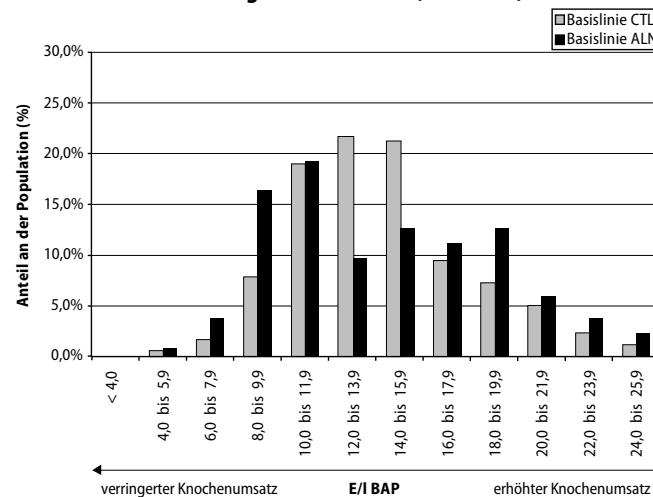
### Überwachung der Wirksamkeit antiresorptiver Therapien bei Osteoporose mit dem MicroVue BAP Assay

Zur Bestimmung der Zuverlässigkeit und Wirksamkeit des MicroVue BAP Assays bei der Überwachung von Änderungen der BAP-Konzentrationen in Serum, die bei antiresorptiven Bisphosphonat-(Alendronat)-Therapien auftreten, wurde eine randomisierte, kontrollierte Multizenterstudie durchgeführt. Die Probanden, die von einer größeren Studie über die Wirksamkeit von Alendronat bei der Behandlung von Osteoporose stammten<sup>7</sup>, waren postmenopausale Frauen im Alter zwischen 45 und 84 Jahren (Mittel  $64 \pm 7$  Jahre), bei denen Osteoporose diagnostiziert wurde (beruhend auf der klinischen oder Basislinien-Knochenmineraldichte der Lendenwirbelsäule [LSBMD], über 2,5 Standardabweichungen unter dem Mittelwert für reife,

prämenopausale Frauen). Die geeigneten Probanden wurden an der Basislinie randomisiert und erhielten entweder 10 mg Alendronat und 500 mg Kalzium täglich (ALN) oder ein Placebo und 500 mg Kalzium täglich (CTL). Die Serumproben wurden von allen Probanden an der Basislinie sowie nach 3, 6 und 12 Monaten entnommen.

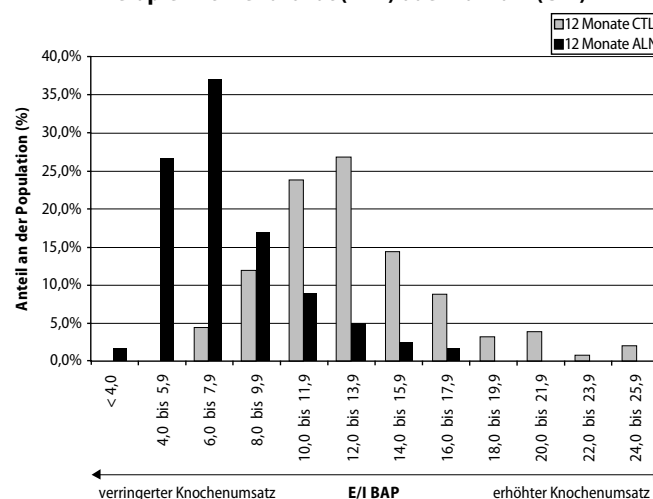
Die mittlere ( $\pm 1$  SA) BAP-Basislinienkonzentration ( $14,6 \pm 5,4$  vs.  $14,6 \pm 4,6$ ,  $p = 0,900$ ) und LSBMD ( $0,74 \pm 0,10$  vs.  $0,75 \pm 0,09$ ,  $p = 0,751$ ) waren vergleichbar für ALN und CTL. In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der BAP-Basislinienwerte in der ALN- und CTL-Gruppe als prozentualer Anteil der Studienpopulation dargestellt.

Verteilung der BAP-Werte (Basislinie)



Nach 3 ( $9,6 \pm 3,5$  vs.  $13,4 \pm 4,0$ ,  $p < 0,00001$ ), 6 ( $8,0 \pm 3,0$  vs.  $13,2 \pm 3,8$ ,  $p < 0,00001$ ) und 12 Monaten ( $7,8 \pm 2,6$  vs.  $13,3 \pm 3,9$ ,  $p < 0,00001$ ) waren die BAP-Werte in der ALN-Gruppe im Vergleich zur CTL-Gruppe signifikant niedriger. In der folgenden Abbildung sind die Verteilungen der BAP-Werte in der ALN- und CTL-Gruppe nach 12 Monaten dargestellt.

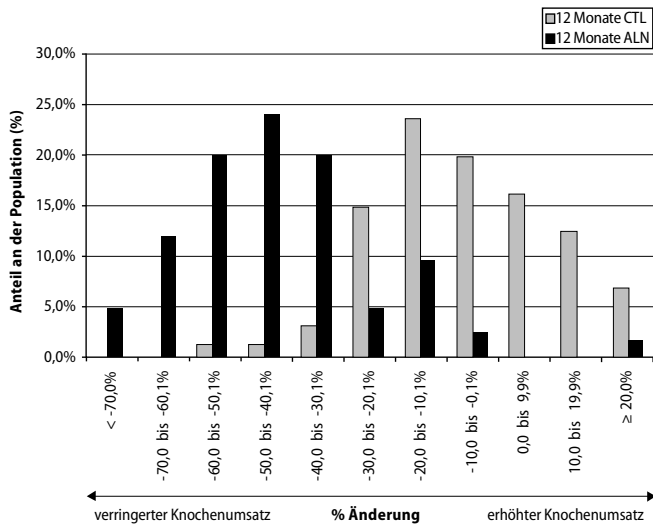
Verteilung der BAP-Werte nach 12 Monaten Therapie mit Alendronat (ALN) oder Kalzium (CTL)



Die mittlere ( $\pm 1$  SA) BAP-Konzentration nahm nach 12 Monaten in den Probanden der CTL-Gruppe von der Basislinie leicht auf  $-5,4$  % ( $\pm 19,1$  %) ab ( $p = 0,00004$ ), was sich u. U. auf die beschränkte knochenhaltende Wirkung des Kalziums zurückführen lässt.<sup>13</sup>

Die mittleren BAP-Konzentrationen nahmen in den Probanden der ALN-Gruppe nach 3 Monaten um  $30,5 \pm 24,6\%$ , nach 6 Monaten um  $42,8 \pm 17,3\%$  und nach 12 Monaten um  $42,2 \pm 19,2\%$  ab. Bei den Probanden der ALN-Gruppe traten im Vergleich zur CTL-Gruppe mit einer höheren Wahrscheinlichkeit BAP-Abnahmen auf, die über einer prozentualen Mindeständerung<sup>14</sup> lagen (ALN: 68,5 %, 83,9 % und 86,1 %; CTL: 9,5 %, 15,9 % und 9,0 %; Abnahme um  $\geq 25\%$  nach 3, 6 und 12 Monaten). In der folgenden Abbildung sind die Verteilungen der prozentualen BAP-Änderungen von der Basislinie in der ALN- und CTL-Gruppe nach 12 Monaten dargestellt.

**Verteilung der prozentualen BAP-Änderungen nach 12 Monaten Therapie mit Alendronat (ALN) oder Kalzium (CTL)**



Wie in der folgenden Abbildung dargestellt, trat bei den Probanden der ALN-Gruppe im Vergleich zur CTL-Gruppe nach 12 Monaten eine LSBMD-Zunahme auf ( $p < 0,00001$ ).

**LSBMD-Änderungen (Mittelwert  $\pm$  SA)**

	n	Basislinie (g/cm <sup>2</sup> )	12 Monate (g/cm <sup>2</sup> )	$\Delta$ (%)
CTL	159	$0,75 \pm 0,09$	$0,74 \pm 0,09$	$-0,6 \pm 3,4$
ALN	121	$0,74 \pm 0,10$	$0,79 \pm 0,10$	$5,5 \pm 4,1$

Diese Ergebnisse zeigen, dass der MicroVue BAP Assay zur Überwachung der antiresorptiven Wirkung von Aminobisphosphonat-(Alendronat)-Therapien bei Probanden mit diagnostizierter Osteoporose zuverlässig und wirksam ist.

**Überwachung antiresorptiver Hormontherapien und Prognose der skelettalen Reaktion (Knochenmineraldichte) bei postmenopausalen Frauen mit Hilfe des MicroVue BAP Assays**

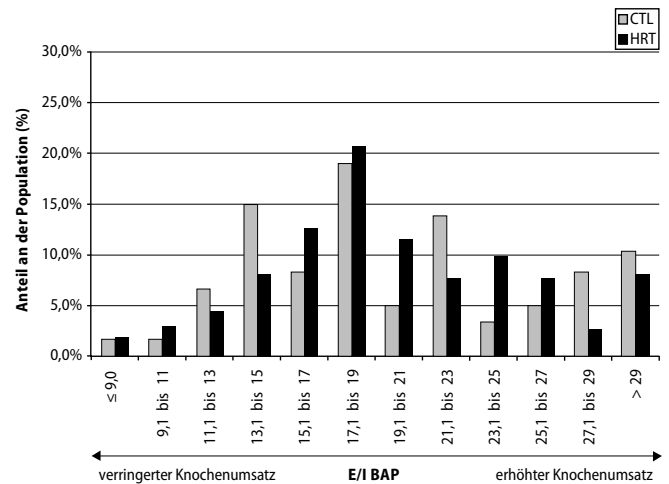
**Überwachung der Therapie:**

Zur Bestimmung der Zuverlässigkeit und Wirksamkeit des MicroVue BAP Assays für die Überwachung von Änderungen der BAP-Konzentrationen in Serum, die bei antiresorptiven Östrogen-/Progesterin-Therapien auftreten, wurde eine randomisierte, kontrollierte Multizenterstudie durchgeführt. Ein postmenopausaler Östrogenmangel geht häufig mit einem erhöhten Knochenumsatz und einem signifikanten Knochenschwund einher. Es wurde gezeigt, dass durch eine Östrogensatztherapie der Knochenumsatz wirksam gesenkt und die vorhandene Knochenmasse geschützt werden kann.<sup>3,6</sup> Bei den

Probanden handelte es sich um postmenopausale Frauen im Alter zwischen 45 und 64 Jahren (Mittelwert  $56 \pm 4$  Jahre) mit natürlicher oder chirurgischer Menopause in den letzten 10 Jahren. Die geeigneten Probanden wurden an der Basislinie randomisiert und entweder einer aktiven Behandlungsgruppe (HRT) (Premarin® [0,625 mg täglich] mit Plazebo-Progesterin, Premarin [0,625 mg täglich] und aktivem Progesterin [Provera® 2,5 mg/Tag und kontinuierlich, Provera 10 mg/Tag zyklisch oder mikronisiertes Progesteron 200 mg/Tag zyklisch] oder der Kontrollgruppe (CTL) (Plazebo-Östrogen und Plazebo-Progesterin) zugewiesen. Die Serumproben wurden von allen Probanden an der Basislinie und nach 12 Monaten entnommen.

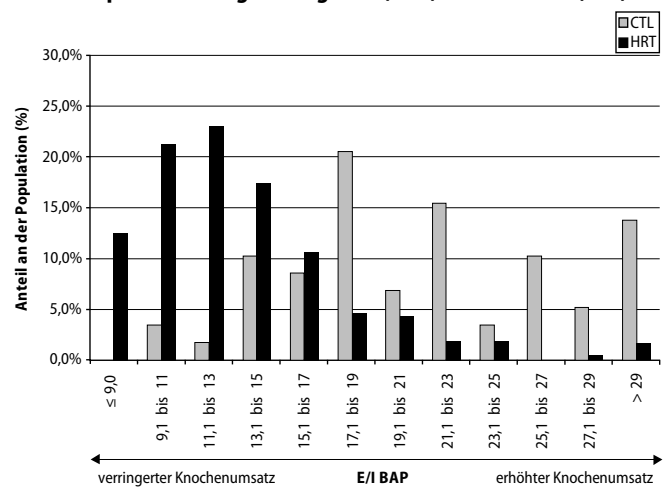
Die mittlere ( $\pm$  SA) BAP-Basislinienkonzentration ( $20,7 \pm 7,6$  vs.  $20,3 \pm 6,8$  E/l,  $p = 0,704$ ) und LSBMD ( $0,97 \pm 0,17$  vs.  $0,97 \pm 0,15$  g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,970$ ) waren in der HRT- und CTL-Gruppe ähnlich. In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der BAP-Basislinienwerte in der HRT- und CTL-Gruppe als prozentualer Anteil der Studienpopulation dargestellt.

**Verteilung der BAP-Werte (Basislinie)**



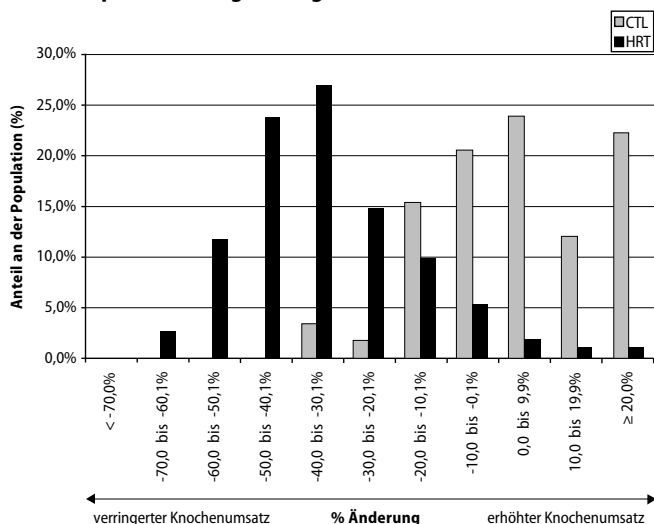
Die BAP-Werte waren in der HRT-Gruppe nach 12 Monaten signifikant niedriger als in der CTL-Gruppe ( $13,3 \pm 5,0$  vs.  $21,9 \pm 7,9$  E/l,  $p < 0,00001$ ). In der folgenden Abbildung sind die Verteilungen der BAP-Werte in der HRT- und CTL-Gruppe nach 12 Monaten dargestellt.

**Verteilung der BAP-Werte nach 12 Monaten Therapie mit Östrogen/Progesterin (HRT) oder Plazebo (CTL)**



Die mittlere ( $\pm 1$  SA) BAP-Konzentration nahm in den Probanden der CTL-Gruppe nach 12 Monaten von der Basislinie etwas auf  $+9,8\%$  ( $\pm 33,2\%$ ) zu ( $p = 0,08$ ), wogegen die BAP-Konzentrationen in den Probanden der HRT-Gruppe im gleichen Zeitraum von der Basislinie auf  $-32,4$  ( $\pm 21,5\%$ ) abnahm ( $p < 0,00001$ ). Bei den Probanden der HRT-Gruppe traten im Vergleich zur CTL-Gruppe mit einer höheren Wahrscheinlichkeit BAP-Abnahmen auf, die über einer prozentualen Mindeständerung<sup>12</sup> lagen ( $73,3\%$  in der HRT-Gruppe und  $3,4\%$  in der CTL-Gruppe, Abnahme um  $\geq 25\%$  nach 12 Monaten). In der folgenden Abbildung sind die Verteilungen der prozentualen BAP-Änderungen von der Basislinie in der HRT- und CTL-Gruppe nach 12 Monaten dargestellt.

#### Verteilung der prozentualen BAP-Änderungen nach 12 Monaten Therapie mit Östrogen/Progesteron (HRT) oder Placebo (CTL)



Wie in der folgenden Abbildung dargestellt, trat bei den Probanden der HRT-Gruppe im Vergleich zur CTL-Gruppe nach 12 Monaten eine LSBMD-Zunahme auf ( $p < 0,00001$ ).

#### LSBMD-Änderungen (Mittelwert $\pm$ SA)

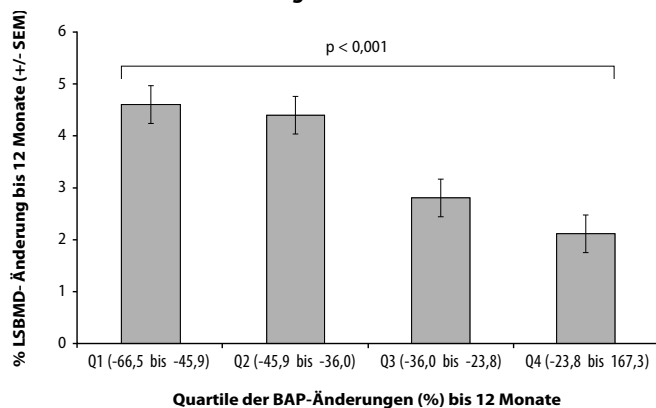
	n	Basislinie (g/cm <sup>2</sup> )	12 Monate (g/cm <sup>2</sup> )	$\Delta$ (%)
CTL	58	0,97 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,16	-1,6 $\pm$ 2,8
HRT	262	0,97 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,15	+3,5 $\pm$ 2,8

Diese Ergebnisse zeigen, dass der MicroVue BAP Assay zur Überwachung der anti-resorptiven Wirkung von Hormonersatztherapien bei postmenopausalen Frauen zuverlässig und wirksam ist.

#### Prognose der skelettalen Reaktion:

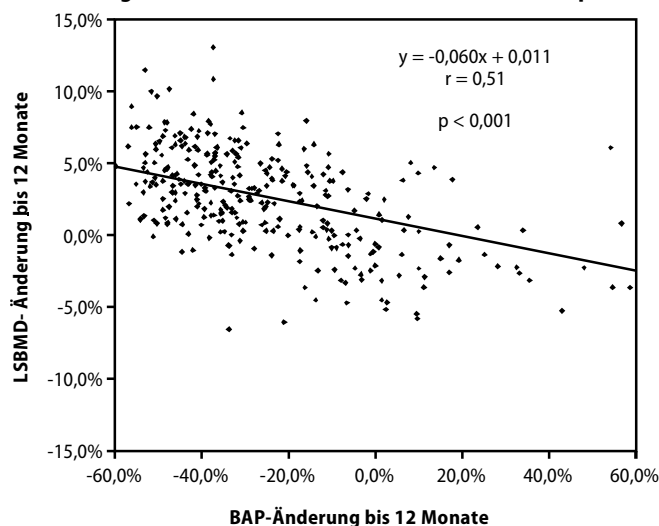
Die prozentuale Abnahme der BAP-Werte von der Basislinie zum 12-Monate-Zeitpunkt ist in der folgenden Abbildung nach Quartil für die HRT-Gruppe dargestellt. Die Probanden im höchsten Quartil (Q1: größte prozentuale Abnahme) zeigten den größten LSBMD-Anstieg als Reaktion auf die HRT-Therapie.

#### HRT-Gruppe – prozentuale BAP-Änderung nach 12 Monaten nach Quartil und die entsprechende prozentuale LSBMD-Änderung über den gleichen Zeitraum



Die lineare Regression ( $y = -0,060x + 0,011$ ,  $r = -0,51$ ,  $p < 0,001$ ) zwischen der prozentualen BAP-Änderung von der Basislinie bis zum 12-Monate-Zeitpunkt und der prozentualen BMD-Änderung von der Basislinie bis zum 12-Monate-Zeitpunkt ist für alle Probanden der Studie (Placebo und Behandlung) in der folgenden Abbildung dargestellt.

#### HRT-Studie – lineare Regression der prozentualen LSBMD- und BAP-Änderungen von der Basislinie bis zum 12-Monate-Zeitpunkt



Eine auf Kontingenz-Tabellen beruhende Analyse hat gezeigt, dass zwischen einer BAP-Abnahme  $\geq 25\%$  nach 12 Monaten und einer positiven skelettalen Reaktion auf HRT (BMD-Zunahme) über den gleichen Zeitraum ein signifikanter ( $p < 0,0001$ ) Zusammenhang besteht. Die binomialen (Approximation 2. Ordnung) 85%-Konfidenzintervalle für die Sensitivität und Spezifität einer 25% igen BAP-Abnahme lauten zum Prognostizieren der Reaktion auf HRT wie folgt:

Sensitivität = 77 % (95 % KI 75 %, 82 %);  
Spezifität = 61 % (95 % KI 41 %, 78 %).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die skelettale Reaktion (BMD) auf die HRT-Behandlung anhand der prozentualen Änderung der BAP-Konzentration prognostiziert werden kann.

## KUNDENDIENST

Informationen zum Serviceangebot außerhalb der USA erhalten Sie von Ihrer Vertretung vor Ort. Zusätzliche Informationen zu Quidel, unseren Produkten und Vertretungen finden Sie auf unserer Website [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## LITERATURVERWEISE

1. Price CP. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantitation. *Ann.Clin.Biochem.* 1993;30:355-372.
2. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr.Rev.* 1994;15:439-461.
3. Riggs BL. Overview of osteoporosis. *West.J.Med.* 1991;154:63-77.
4. Garnero P, Delmas PD. Clinical usefulness of markers of bone remodeling in osteoporosis. In: Meunier PJ (ed.). *Osteoporosis: Diagnosis and management*. London: Martin Dunitz, 1998:79-101.
5. Singer FR, Roodman GD. Paget's disease of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (ed.). *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press, 1996:969-977.
6. Consensus Development Statement. Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? *Osteoporos.Int.* 1997;7:1-6.
7. Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N.Engl.J.Med.* 1995;333:1437-1443.
8. Price CP, Thompson PW. The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. *Ann.Clin.Biochem.* 1995;32:244-260.
9. Meunier PJ, Vignot E. Therapeutic strategy in Paget's disease of bone. *Bone* 1995;17(Suppl.):489S-491S.
10. Gomez B, Jr., Ardakani S, Ju J, et al. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin.Chem.* 1995;41:1560-1566.
11. Pedrazzoni M, Alfano FS, Girasole G, et al. Clinical observations with a new specific assay for bone alkaline phosphatase: A cross-sectional study in osteoporotic and pagetic subjects and a longitudinal evaluation of the response to ovariectomy, estrogens, and bisphosphonates. *Calcif.Tissue Int.* 1996;59:334-338.
12. Garnero P, Shih WJ, Gineyts E, Karpf DB, Delmas PD. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1994;79:1693-1700.
13. Reid IR, Ames RW, Evans MC, Gamble GD, Sharpe SJ. Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women: A randomized controlled trial. *Am.J.Med.* 1995;98:331-335.
14. Fraser CG. Data on biological variation: essential prerequisites for introducing new procedures? [Editorial] *Clin.Chem.* 1994;40:1671-1673.
15. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.

## GLOSSAR



Gebrauchsanweisung beachten auf CDROM



Verwendungszweck

REF 8012 – **MICROVUE** BAP EIA Kit  
Bone Health

 **QUIDEL**<sup>®</sup>  
CORPORATION  
SPECIALTY PRODUCTS  
RESEARCH TO RAPIDS<sup>™</sup>

Quidel Corporation | 10165 McKellar Court  
San Diego, CA 92121 USA | [www.quidel.com](http://www.quidel.com)

**CE**

**EC REP**

MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany