

Saggio immunoenzimatico per la quantizzazione della fosfatasi alcalina osso-specifica (BAP) nel siero umano

### MicroVue™ BAP EIA Sommario

#### Preparato di il Campione ed il reagente

- Diluire la Tampone di Lavaggio 10X 1:10 con acquadeionizzata.

#### Procedura del Saggio

Aggiungere 125 µL Tampone del Saggio in pozzetto di test

Aggiungere 20 µL ciascuno Standard, Controllo e Campione in pozzetti di test (*Agitare delicatamente le strisce per garantire lamiscelazione del campione e del tampone.*)

Incubare per 3 Ore ± 10 minuti a 20 – 28 °C

Lavare 4X con la Tampone de Lavaggio

- Preparare la Soluzione de Substrato (30 – 60 min prima dell'uso) *Porre una tavoletta di substrato in ciascun flacone necessario ditampone di substrato (agitare vigoroso)*

Aggiungere 150 µL di Soluzione Attiva di Substrato

Incubare per 30 ± 5 minuti a 20 – 28 °C

Aggiungere 100 µL di Soluzione Bloccante

Leggere la densità ottica a 405 nm. Analizzi i risultati di analisi usando una misura quadratica della curva  
 $y = A + Bx + Cx^2$

### FINALITÀ D'USO

Il saggio immunoenzimatico MicroVue BAP fornisce una misura quantitativa dell'attività della fosfatasi alcalina osso-specifica (bone-specific alkaline phosphatase, BAP) nel siero come indicatore dell'attività osteoblastica. La misura di BAP è prevista per l'uso come ausilio:

- nella gestione dell'osteoporosi della postmenopausa e del morbo di Paget;
- nel monitoraggio delle donne in postmenopausa che fanno uso di una terapia ormonale o a base di bisfosfonato;
- nella previsione di una risposta scheletrica alla terapia ormonale in donne in postmenopausa.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

L'isoformio scheletrico, o osso-specifico della fosfatasi alcalina è una glicoproteina tetramericata riscontrata nella superficie cellulare degli osteoblasti.<sup>1</sup> Gli osteoblasti sono le cellule responsabili della sintesi della matrice del nuovo osso e della sua mineralizzazione. La funzione di BAP non è stata spiegata completamente, sebbene sia stato confermato il suo ruolo nella mineralizzazione scheletrica.<sup>1,2,3</sup>

L'osso è costantemente sottoposto a un processo metabolico denominato rimodellazione.<sup>3,4</sup> Tale processo comprende una fase di degradazione, riassorbimento dell'osso, mediato dall'azione degli osteoclasti, e una fase di generazione, formazione dell'osso, mediata dall'azione degli osteoblasti.<sup>3,4</sup> La rimodellazione è necessaria per il mantenimento, in generale per la salute dell'osso ed è strettamente abbinata; vale a dire che il riassorbimento e la formazione sono bilanciati.<sup>3,4</sup> In condizioni anormali del metabolismo dell'osso, questo processo non va di pari passo e quando il riassorbimento supera la formazione, si ha una perdita netta dell'osso, che può portare all'osteoporosi<sup>3,4</sup> o alla comparsa di lesioni pagetiche nel tessuto osseo con disordini.<sup>5</sup> La misurazione dei marcatori biochimici specifici di tali casi di rimodellazione fornisce i dati analitici relativi al tasso di metabolismo osseo o "ricambio".<sup>3,4</sup>

L'osteoporosi è una malattia metabolica dell'osso caratterizzata da una rimodellazione anormale dell'osso. Si tratta di una malattia scheletrica sistemica, caratterizzata da minore massa ossea e deterioramento della microarchitettura del tessuto osseo, con un conseguente aumento della suscettibilità alle fratture.<sup>6</sup> Il tipo maggiormente comune di osteoporosi si verifica in donne in postmenopausa in seguito alla mancanza di estrogeni causata dalla cessazione della funzione ovarica.<sup>3</sup> Il ripristino dei livelli di estrogeno in premenopausa con una terapia sostitutiva impedisce la perdita ossea e l'osteoporosi.<sup>3,6</sup> Gli estrogeni e una classe di composti conosciuti come bisfosfonati rappresentano delle terapie anti-riassorbenti che possono essere usate per impedire la perdita ossea o per curare l'osteoporosi.<sup>3,6,7</sup>

È possibile anche che l'osteoporosi provochi una massa ossea con picco inadeguato durante gli anni di crescita, uno squilibrio della rimodellazione dell'osso riferito all'età con un eccesso netto di riassorbimento e numerose condizioni cliniche e terapie che inducono la perdita ossea o gli squilibri della rimodellazione dell'osso.<sup>3</sup> Queste comprendono malattie endocrine quali ipogonadismo, ipertiroidismo, iperparatiroidismo, ipercortisonismo; blocco renale; tumori metastatici dell'osso; malattie gastrointestinali riferite al metabolismo della nutrizione e minerale; malattie del tessuto connettivo; mieloma multiplo; immobilizzazione cronica, alcolismo o uso di tabacco e terapia cronica con eparina o corticosteroidi.<sup>3</sup>

Il morbo di Paget dell'osso costituisce un disordine focale che provoca dolore e deformità scheletrica in pazienti sintomatici.<sup>5</sup> Le lesioni pagetiche, caratterizzate da matrice ossea dalla struttura estremamente anormale, nascono da tassi eccessivi dell'attività di rimodellazione. Le lesioni si verificano in modo predominante nel cranio, nella colonna vertebrale, nella pelvi e nelle ossa lunghe e possono causare fratture e un peggioramento neurologico.<sup>5</sup> L'eziologia del morbo di Paget non è accertata, ma vengono avvalorate le ipotesi che comprendono fattori genetici e virali.<sup>5</sup> Attualmente vengono usati i bisfosfonati e la calcitonina per eliminare il tasso elevato di attività biochimica a livelli normali, che consente il ripristino della struttura ossea normale.<sup>9</sup>

Come misura quantitativa di un marcatore del ricambio osseo, BAP fornisce informazioni utili sulla rimodellazione ossea in pazienti affetti da osteoporosi e morbo di Paget e sulle modifiche nell'attività della malattia prodotte da una terapia anti-riassorbente.<sup>10-12</sup> Per il saggio MicroVue BAP è stata impiegata la tecnologia degli anticorpi allo scopo di produrre un anticorpo monoclonale che dimostri la specificità di BAP.<sup>10</sup> La specificità dell'anticorpo monoclonale usato nel saggio consente la quantificazione in modo semplice, comodo, riproducibile e diretto dell'attività di BAP in siero.

## PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

MicroVue BAP è un saggio immunoenzimatico in formato di striscia per microtitolazione che utilizza un anticorpo monoclonale anti-BAP rivestito sulla striscia al fine di catturare la BAP nel campione. L'attività enzimatica della BAP catturata viene rilevata con un substrato di pNPP.

## REAGENTI E MATERIALI FORNITI

### 96 saggi per fosfatasi alcalina osso-specifica

**MicroVue BAP EIA contiene i seguenti materiali e reagenti:**

#### **A Standard BAP A – F**

**B** Codici da 4395 a 4400 0,4 mL ciascuno

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

**D** BAP purificata dalle cellule dell'osteosarcoma SAOS-2 in

una soluzione tamponata contenente cloruro di magnesio,

**E** solfato di zinco, tensioattivo, proteina carrier, colorante blu e

**F** azide di sodio (0,05%) come conservante

#### **L Campioni di controllo inferiori/superiori**

**H** Codici 4401, 4402 0,4 mL ciascuno

BAP purificata dalle cellule dell'osteosarcoma SAOS-2 in una soluzione tamponata contenente cloruro di magnesio, solfato di zinco, tensioattivo, proteina carrier, colorante blu e azide di sodio (0,05%) come conservante

**1 Strisce rivestite** Codice 4660 12 pezzi  
Anticorpo monoclonale IgG Anti-BAP murino purificato assorbito nei telai Stripwell

**2 Soluzione bloccante** Codice 4702 15 mL  
0,5N NaOH

**3 Tampone di lavaggio 10X** Codice 4703 55 mL  
Detergente non ionico in una soluzione tamponata contenente azide di sodio (0,05%) come conservante

**4 Tampone del saggio** Codice 4403 27 mL  
Soluzione tamponata contenente cloruro di magnesio, solfato di zinco, tensioattivo e azide di sodio (0,05%) come conservante

**5 Tampone del substrato** Codice 4404 3 x 10 mL  
Soluzione di 2-amino-2-metil-1-propanolo contenente HEDTA, cloruro di magnesio, solfato di zinco e azide di sodio (0,05%) come conservante

**6 Tavolette di substrato** Codice 0012 3 x 20 mg  
Fosfato di p-Nitrofenile

## MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Micropipette per la fornitura di 20 µL e 100-300 µL
- Elementi adatti per la misurazione di liquidi da 100-300 mL
- Contenitore per la diluizione del tampone di lavaggio
- Acqua deionizzata o distillata
- Lettore per piastra in grado di effettuare letture alla densità ottica di  $A_{405} > 2,0$
- Software per adattamento della curva di calibrazione quadratica

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *In Vitro*.
2. Trattare i campioni come materiale a potenziale rischio biologico. Seguire le precauzioni generali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualunque campione paziente.
3. Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con i requisiti delle normative federali, statali e locali.
4. Usare i reagenti forniti come un'unità integrale prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
5. Conservare i reagenti del saggio come indicato.
6. Non usare le strisce rivestite se la busta protettiva è danneggiata.
7. Sottoporre a test ciascun campione in duplicato.
8. Indossare adeguati indumenti di protezione, guanti e protezioni per occhi/viso durante la manipolazione del contenuto di questo kit.
9. 0,5N NaOH è considerato corrosivo e può causare irritazioni alla cute. Non ingerirlo. Evitare il contatto con la cute, gli occhi o gli indumenti. Se avviene il contatto, lavare con acqua. Se ingerito, consultare un medico.
10. L'azide di sodio viene usato come conservante. Il contatto o l'ingestione accidentale di tamponi contenenti azide di sodio può causare irritazioni alla cute, agli occhi o alla bocca. Usare esclusivamente i tamponi per gli scopi previsti ed evitare il contatto con gli acidi. È possibile che l'azide di sodio reagisca con tubazioni in rame e in piombo e formi azidi metallici altamente esplosivi. Dopo lo smaltimento, lavare con una grande quantità di acqua per impedire l'accumulo di azide.

11. Il tampone del substrato contiene 2-amino-2-metil-1-propanolo e, in caso di contatto prolungato, può provocare irritazione agli occhi e/o alla cute. Occorre lavare immediatamente con sapone e acqua le aree entrate in contatto.
12. Si consiglia l'uso di pipette multicanale o di pipettatori a ripetizione per garantire la fornitura veloce dei reagenti.
13. Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere accuratamente i campioni e gli standard. Pipettare attentamente, usando esclusivamente apparecchiature calibrate.
14. Diluire i campioni maggiori di 140 U/L nel tampone del saggio ed effettuare di nuovo il test. Comprendere il fattore di diluizione nel calcolo finale.
15. È possibile eseguire questo saggio con qualunque metodo di lavaggio omologato.

## PREPARAZIONE DEI REAGENTI

**Prima dell'uso, portare i reagenti e i materiali per il saggio a 20–28°C. Dopo la rimozione dei reagenti e materiali necessari, conservare gli elementi inutilizzati a 2–8°C.**

### Strisce rivestite

Rimuovere dalla busta protettiva il telaio Stripwell e il numero necessario di strisce rivestite (fare riferimento alla tabella nella sezione *PROCEDURA DEL SAGGIO*). Verificare che la busta protettiva contenente eventuali strisce inutilizzate venga risigillata completamente.

### Tampone di lavaggio

Preparare la quantità necessaria di tampone di lavaggio 1X (fare riferimento alla tabella) diluendo con acqua deionizzata il tampone di lavaggio concentrato in un rapporto di 1:10. Conservare a 20–28°C. Utilizzare il tampone di lavaggio 1X entro 21 giorni dalla preparazione.

### Soluzione di substrato attiva

Preparare la soluzione di substrato attiva entro 1 ora dall'utilizzo. Porre una tavoletta di substrato in ciascun flacone necessario di tampone di substrato a 20–28°C (fare riferimento alla tabella). Lasciar trascorrere 30–60 minuti per consentire alle tavolette di dissolversi. Agitare accuratamente i flaconi al fine di miscelarli completamente. Dopo l'uso, gettare la rimanente soluzione di substrato attiva.

## CONSERVAZIONE

Conservare i kit a 2–8°C. Non congelare. Conservare i reagenti inutilizzati a 2–8°C. Prima dell'uso, equilibrare i reagenti a 20–28°C. Conservare il tampone di lavaggio 1X (diluito 10X) a 20–28°C.

## PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Prelevare il siero adottando una tecnica di venopuntura standard. È necessario prelevare i campioni senza usare anticoagulanti e in modo da evitare l'emolisi. Lasciare che il sangue coaguli e separare il siero tramite centrifugazione. È possibile conservare il siero per 5 giorni a 2–8°C, a ≤ -40°C per 12 mesi, oppure a ≤ -80°C per 36 mesi. Non sottoporre i campioni a più di 3 cicli di congelamento/decongelamento.

Il siero senza coaguli, quello in provetta proveniente da un separatore per siero, il plasma di eparina Na e il plasma di eparina Li forniscono sostanzialmente risultati equivalenti. Si sconsiglia di preparare i campioni di plasma facendo uso di chelanti quali EDTA o citrato.

## PROCEDURA DEL SAGGIO

**Prima di iniziare il saggio, leggere completamente l'inserto fornito con il prodotto.**

Prima di procedere, fare riferimento a *PREPARAZIONE DEI REAGENTI*.

**Determinare la quantità necessaria di ciascun reagente per il numero di strisce da usare.**

# di strisce	4	6	8	12
# di campioni (sottoposti a test in duplicato)	8	16	24	40
Substrato (flacone)	1	1	2*	2*
Tampone di lavaggio 1X (mL)	100	150	200	300

\*Quando viene usato più di un flacone o di una fiala, unire i contenuti e miscelarli prima dell'uso.

### Incubazione del campione

1. Rimuovere il telaio Stripwell dalla busta protettiva e il numero necessario di strisce rivestite (fare riferimento alla tabella) immediatamente prima dell'uso. Verificare che la busta protettiva metallizzata contenente qualunque striscia inutilizzata venga risigillata completamente.
2. Porre il numero desiderato di strisce rivestite nel telaio Stripwell. Etichettare le strisce per evitare di fare confusione nel caso di una rimozione accidentale dal telaio Stripwell.
3. Aggiungere 125 µL di tampone del saggio in ciascun pozzetto.
4. Aggiungere 20 µL di standard, campione di controllo o campione in ciascun pozzetto. **Non** miscelarli con il tampone del saggio pipettando nuovamente. È necessario completare questa fase entro 30 minuti. **Agitare delicatamente le strisce per garantire la miscelazione del campione e del tampone.**
5. Incubare per 3 ore (± 10 minuti) a 20–28°C.
6. Preparare la soluzione di substrato attiva entro 1 ora dall'utilizzo. Porre una tavoletta di substrato in ciascun flacone necessario di tampone di substrato a 20–28°C (fare riferimento alla tabella). Lasciar trascorrere 30–60 minuti per consentire alle tavolette di dissolversi. Agitare accuratamente i flaconi al fine di miscelarli completamente.

## Fase di lavaggio

7. Preparare la quantità necessaria di tampone di lavaggio 1X (fare riferimento alla tabella) diluendo con acqua deionizzata il tampone di lavaggio concentrato in un rapporto di 1:10. Conservare a 20–28°C. Utilizzare il tampone di lavaggio 1X entro 21 giorni dalla preparazione.
8. Capovolgere/svuotare manualmente le strisce. Aggiungere a ciascun pozzetto almeno 250 µL di tampone di lavaggio 1X e capovolgere/svuotare le strisce. Ripetere la procedura per altre tre volte, per un totale di quattro lavaggi. Asciugare accuratamente le strisce su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.

## Incubazione del substrato

9. Aggiungere a ciascun pozzetto 150 µL di soluzione attiva di substrato. Dopo l'uso, gettare la rimanente soluzione di substrato attiva.
10. Incubare per 30 minuti (± 5 minuti) a 20–28°C.

## Arresto/Lettura

11. Aggiungere a ciascun pozzetto 100 µL di soluzione bloccante. Aggiungere soluzione bloccante dello stesso tipo e a intervalli di tempo uguali all'aggiunta della soluzione di substrato.
12. Leggere la densità ottica a 405 nm. Garantire che nei pozzetti non sia presente alcuna bolla grande e che le estremità inferiori delle strisce siano pulite. È necessario leggere le strisce entro **15 minuti** dall'aggiunta della soluzione bloccante.
13. **È necessario** fare uso del software di quantizzazione con equazione di adattamento della curva di calibrazione quadratica per l'analisi dei risultati del saggio MicroVue BAP.  
Equazione:  $y = A + Bx + Cx^2$

## CONTROLLO DI QUALITÀ

Il certificato di analisi compreso in questo kit è specifico per il lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal laboratorio siano simili a quelli ottenuti da Quidel. Vengono forniti valori della densità ottica che sono da usare esclusivamente come direttiva. È possibile che i risultati ottenuti dal laboratorio differiscano.

Vengono forniti i valori di gamma per il controllo di qualità. I valori di controllo sono destinati a verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri per la definizione dei limiti di accettazione del saggio. Se i valori di controllo NON sono all'interno dei limiti di accettazione del laboratorio, i risultati del saggio devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i campioni.

Se la densità ottica di MicroVue BAP Standard F è inferiore a 1,0, i risultati devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i campioni.

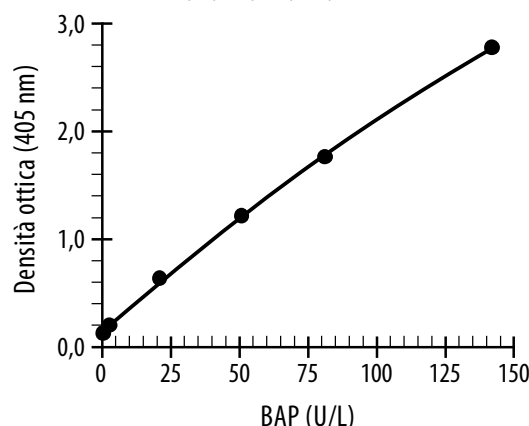
## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dei campioni sono espressi come U/L e **non** necessitano di correzione per la diluizione (a meno che il campione non sia stato diluito prima del test).

Nel saggio MicroVue BAP, 1 unità rappresenta 1 µmol di pNPP idrolizzato per minuto a 25°C in un tampone di 2-amino-2-metil-1-propanolo.

## Curva standard rappresentativa

Livelli standard BAP: 0, 2, 20, 50, 80, 140 U/L



## LIMITI DELLA PROCEDURA

### Interferenza HAMA

Alcuni individui hanno anticorpi anti-anticorpo di topo (HAMA), che possono causare interferenze nei saggi immunologici che impiegano anticorpi derivati dai topi. In particolare è stato riscontrato che i campioni di siero di pazienti che sono stati sottoposti a terapia o a procedure diagnostiche che comprendono l'infusione di anticorpo monoclonale di topo possono fornire risultati errati. Pertanto, per alcuni pazienti, si dovranno usare i risultati MicroVue BAP solo unitamente ai risultati provenienti da altre procedure diagnostiche e con informazioni disponibili della valutazione clinica del paziente.

I campioni con elevazioni significative di attività di fosfatasi alcalina del fegato possono provocare risultati elevati in modo aberrante nel saggio MicroVue BAP.

I pazienti affetti dal morbo di Paget con bassi livelli di tale malattia possono avere livelli di fosfatasi alcalina osso-specifica che rientrano nella gamma di riferimento di MicroVue BAP.

## RISULTATI DEL CAMPIONE

I valori di riferimento BAP sono stati stabiliti per uomini normali con oltre 25 anni di età (n = 126), donne normali in premenopausa di età compresa fra 25 e 44 anni (n = 178) e donne normali in postmenopausa (n = 107). Per gli scopi della determinazione dei valori di riferimento, i soggetti normali sono stati definiti come:

- fondamentalmente sani, nessun disordine delle ossa, endocrino o cronico
- con cicli mestruali regolari (donne in premenopausa)
- nessuna gravidanza o allattamento al seno (donne)
- nessuna assunzione di farmaci attualmente accertata che influenzi il metabolismo osseo

È possibile che i valori siano influenzati da alcuni fattori come bassa produzione di estrogeni, minore assunzione di calcio o minore attività fisica.<sup>3</sup> La mancanza di estrogeni in donne in postmenopausa può causare un elevato ricambio osseo.<sup>3,4</sup>

È necessario che ciascun laboratorio stabilisca il proprio valore normale di riferimento. I valori vengono espressi come intervalli di riferimento non parametrici (90% CI).

Età (Anni)			Valore (U/L)	Medio
Donne	25 - 44	Premenopausa	11,6 - 29,6	18,3
Donne	≥ 45	Postmenopausa	14,2 - 42,7	25,0
Uomini	≥ 25		15,0 - 41,3	23,2

## CARATTERISTICHE DEL METODO

### Specifiche dell'anticorpo

L'anticorpo della fosfatasi alcalina osso-specifica ha un'elevata affinità selettiva per l'isoformio della fosfatasi alcalina osso-specifica, minore reattività crociata rispetto alla forma epatica della fosfatasi alcalina e legame irrilevante con gli isoenzimi intestinali e della placenta.

Isoenzima AP	Reattività in %
Osso	100
Fegato	3 - 8
Placenta	0
Intestino	0,4

### Sensibilità

Il limite di rilevamento minimo del saggio MicroVue BAP è di 0,7 U/L, determinato dal limite superiore di 3 DS in uno studio di precisione a standard zero.

### Recupero - Recupero dei picchi

Il recupero dei picchi è stato determinato aggiungendo una quantità nota di BAP purificata ai campioni di siero con livelli diversi di BAP endogena. I risultati tipici vengono forniti dopo aver testato campioni di siero con concentrazioni di BAP basse, medie ed elevate e valutandoli in triplicato.

Endogeno (U/L)	Aggiunto (U/L)	Osservato (U/L)	Recupero (%)
13,4	15,7	29,1	99
17,6	37,5	55,3	99
27,2	57,2	88,1	106

### Recupero - Linearità

La linearità è stata determinata diluendo in modo seriale i campioni e confrontando i valori osservati con i risultati attesi. I risultati tipici vengono forniti di seguito.

Campione	Fattore di diluizione	Osservato (U/L)	Atteso (U/L)	Recupero (%)
1	non diluito	108,5	-	-
	1:2	51,1	54,2	94
	1:4	25,8	27,1	99
	1:6	18,0	18,1	99
2	non diluito	39,1	-	-
	1:2	20,1	19,5	103
	1:4	10,3	9,8	105
	1:6	6,7	6,5	103
3	non diluito	58,4	-	-
	1:2	29,9	29,2	102
	1:4	15,7	14,6	108
	1:6	9,7	9,7	100

## Precisione

La precisione all'interno di una stessa corsa è stata determinata per ≥ 21 ripetizioni di 3 campioni su 3 piastre da ciascuno dei 3 lotti di kit (9 piastre in totale). La precisione fra le corse è stata determinata dall'analisi di 3 campioni in 6 piastre separate da ciascuno dei 3 lotti di kit (18 piastre in totale). I risultati tipici vengono forniti di seguito.

BAP (U/L BAP)	All'interno di una stessa corsa <sup>1</sup> CV%	Fra le corse <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 corse

## Sostanze interferenti

Le seguenti sostanze sono state sottoposte a test alle concentrazioni specificate e non interferiscono con il saggio.

Sostanza	Concentrazione
Emoglobina	500 mg/dL
Bilirubina	25 mg/dL
Trigliceridi	1420 mg/dL
Proteina totale	6,0 g/dL †
Proteina totale	15,6 g/dL †
Proteina totale	6,0 g/dL ‡
Proteina totale	15,6 g/dL ‡

† Proteina con acqua

‡ Proteina con BAP (concentrazione di BAP = 43,6 U/L)

## Interferenze di farmaci

Sono state aggiunte varie concentrazioni di farmaci a tre gruppi di siero separati, contenenti circa 35, 70 e 105 U/L BAP, che sono stati analizzati in triplicato. I farmaci e le concentrazioni più elevate sottoposte a test sono state:

Sostanza	Concentrazione più elevata
Etidronato	350 µg/mL
Estrogeno	100 µg/mL
Ibuprofene	150 µg/mL
Acetaminofene	350 µg/mL
Aspirina	350 µg/mL
Calcitonina - umana	80 µg/mL
Calcitonina - del salmone	80 µg/mL
Calcio	500 µg/mL
Miscela di noretindrone/etinil-estradiolo (contraccettivo orale)	3 mg/mL
Vitamina D	400 IU/mL

## Precisione

Sono stati eseguiti studi comparativi per valutare le correlazioni fra le misure della fosfatasi alcalina osso-specifica del siero (BAP) ottenute usando il saggio MicroVue BAP rispetto ai risultati ottenuti usando i tre metodi attualmente contrassegnati per la misurazione della fosfatasi alcalina totale (TAP) o BAP. Gli studi sono stati condotti in un sito per indagine clinica indipendente, utilizzando i sieri di 114 pazienti con il morbo di Paget e di 464 soggetti sani. Il primo metodo comparativo è stata una tecnica colorimetrica per la misurazione di TAP. Il coefficiente di correlazione ( $r$ ) ottenuto fra tale metodo colorimetrico e il saggio MicroVue BAP è stato di 0,99. Il secondo metodo comparativo è stato un metodo di elettroforesi per la determinazione dei livelli dell'isoenzima di BAP ( $r = 0,99$ ). Il terzo metodo comparativo è stato un saggio immunoradiometrico per la misurazione di BAP ( $r = 0,99$ ). Dei 114 pazienti avevano valori maggiori rispetto al limite superiore dei valori di riferimento per il saggio MicroVue BAP. Tredici pazienti avevano valori inferiori rispetto al limite superiore dei valori di riferimento.

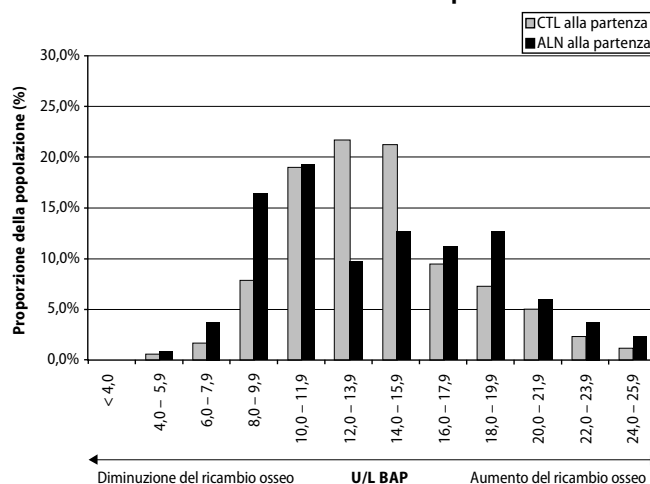
## STUDI CLINICI

### Uso di MicroVue BAP per il monitoraggio dell'efficacia della terapia anti-riassorbente nell'osteoporosi

Uno studio policentrico, randomizzato e controllato è stato condotto con successo per stabilire la sicurezza e l'efficacia del saggio MicroVue BAP, al fine di monitorare i cambiamenti nelle concentrazioni di BAP nel siero associate a una terapia anti-riassorbente con amino-bisfosfonato (alendronato). I soggetti, prelevati da uno studio più ampio sull'efficacia dell'alendronato per il trattamento dell'osteoporosi,<sup>7</sup> erano donne in postmenopausa, con un'età compresa tra 45 e 84 anni (media  $64 \pm 7$  anni), affette da osteoporosi (basata sulla presentazione clinica o sulla densità minerale dell'osso della colonna vertebrale lombare [LSBMD] con oltre 2,5 deviazioni standard sotto la media delle donne mature in premenopausa). Al momento della partenza, i soggetti idonei sono stati randomizzati in modo da ricevere 10 mg di alendronato e 500 mg di calcio al giorno (ALN) oppure un placebo e 500 mg di calcio al giorno (CTL). I campioni di siero sono stati ottenuti alla partenza, a 3, 6 e 12 mesi da tutti i soggetti.

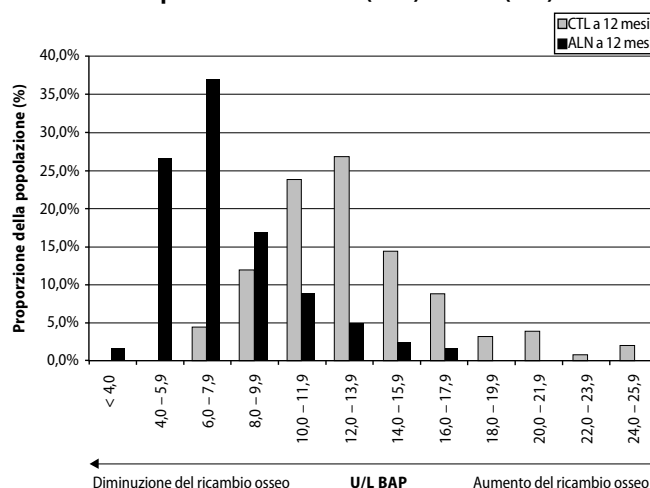
La concentrazione media di BAP alla partenza ( $\pm 1$ DS) ( $14,6 \pm 5,4$  in contrapposizione a  $14,6 \pm 4,6$ ,  $p = 0,900$ ) e quella di LSBMD ( $0,74 \pm 0,10$  in contrapposizione a  $0,75 \pm 0,09$ ,  $p = 0,751$ ) erano valori simili sia per ALN che per CTL. Le distribuzioni dei valori BAP alla partenza in ALN e CTL sono descritte nella seguente figura in proporzione rispetto alla popolazione dello studio.

Distribuzione dei livelli BAP alla partenza



BAP era significativamente più bassa per ALN che per CTL a 3 ( $9,6 \pm 3,5$  in contrapposizione a  $13,4 \pm 4,0$ ,  $p < 0,00001$ ), 6 ( $8,0 \pm 3,0$  in contrapposizione a  $13,2 \pm 3,8$ ,  $p < 0,00001$ ) e 12 mesi ( $7,8 \pm 2,6$  in contrapposizione a  $13,3 \pm 3,9$ ,  $p < 0,00001$ ). Le distribuzioni dei valori di BAP dopo 12 mesi nei gruppi ALN e CTL sono descritte nella seguente figura.

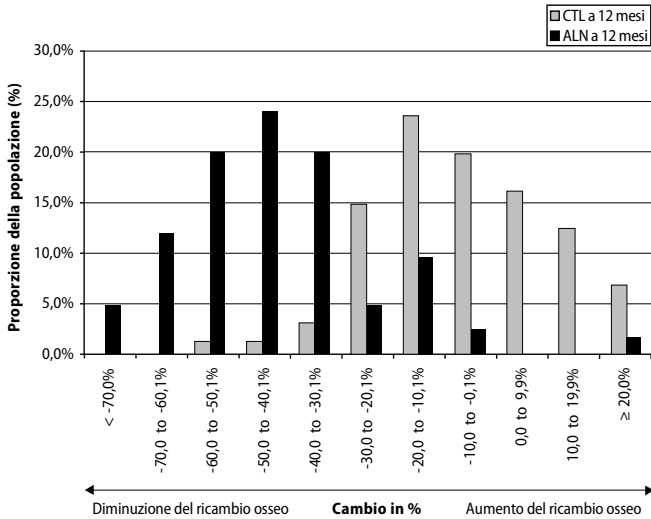
Distribuzione dei livelli BAP dopo 12 mesi Terapia con alendronato (ALN) o calcio (CTL)



La concentrazione media di BAP ( $\pm 1$ DS) nei soggetti del gruppo CTL è diminuita lievemente rispetto alla partenza a  $-5,4\%$  ( $\pm 19,1\%$ ) a 12 mesi ( $p = 0,00004$ ) cosa che può riflettere l'effetto limitato di preservazione dell'osso svolto dal calcio.<sup>13</sup>

Le concentrazioni medie di BAP nei soggetti del gruppo ALN sono diminuite del  $30,5 \pm 24,6\%$  a 3 mesi,  $42,8 \pm 17,3\%$  a 6 mesi e  $42,2 \pm 19,2\%$  a 12 mesi. I soggetti del gruppo ALN erano quelli che, più probabilmente dei soggetti CTL, hanno potuto dimostrare delle perdite di BAP oltre il cambio minimo di percentuale<sup>14</sup>, con il 68,5%, l'83,9% e l'86,1% degli individui ALN e il 9,5%, il 15,9% e il 9,0% degli individui CTL, diminuendo di  $\geq 25\%$  ai vari momenti dopo 3, 6 e 12 mesi. Le distribuzioni del cambio di percentuale rispetto alla partenza nei valori BAP dopo 12 mesi nei gruppi ALN o CTL sono descritte nella seguente figura.

**Distribuzione del cambio di percentuale nei livelli BAP dopo 12 mesi Terapia con alendronato (ALN) o calcio (CTL)**



A 12 mesi, i soggetti del gruppo ALN hanno aumentato la LSBMD se confrontati con quelli del CTL ( $p < 0,00001$ ) come mostrato nella seguente tabella.

**Modifiche in LSBMD (media ± DS)**

	n	Alla partenza (g/cm <sup>2</sup> )	12 mesi (g/cm <sup>2</sup> )	Δ (%)
CTL	159	0,75 ± 0,09	0,74 ± 0,09	-0,6 ± 3,4
ALN	121	0,74 ± 0,10	0,79 ± 0,10	5,5 ± 4,1

Questi risultati indicano che il saggio MicroVue BAP è sicuro ed efficace per il monitoraggio dell'effetto anti-riassorbente della terapia dell'amino-bisfosfonato (alendronato) fra soggetti affetti da osteoporosi.

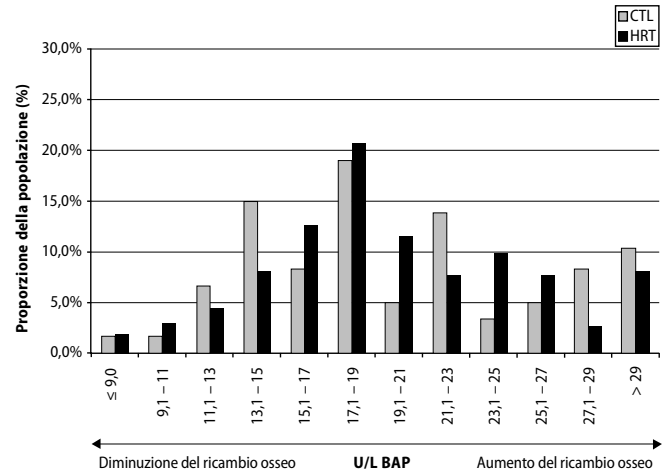
**Uso di MicroVue BAP per il monitoraggio della terapia ormonale anti-riassorbente e per la previsione della risposta scheletrica (densità minerale dell'osso) in donne in postmenopausa**

**Terapia di monitoraggio:**

Uno studio policentrico, randomizzato e controllato, è stato condotto con successo per stabilire la sicurezza e l'efficacia del saggio MicroVue BAP, al fine di monitorare i cambiamenti delle concentrazioni di BAP nel siero associate a una terapia anti-riassorbente con estrogeni/progestina. L'accresciuto ricambio osseo e la perdita significativa dell'osso sono spesso associati alla mancanza di estrogeni in postmenopausa. La sostituzione degli estrogeni ha dimostrato di diminuire efficacemente il ricambio dell'osso e di proteggere la massa ossea esistente.<sup>3,6</sup> I soggetti erano donne in postmenopausa, con un'età compresa tra 45 e 64 anni (in media 56 ± 4 anni), che hanno subito una menopausa naturale o chirurgica negli ultimi 10 anni. Alla partenza, i soggetti idonei sono stati randomizzati in un gruppo di trattamento attivo (HRT) con: Premarin® (0,625 mg al giorno) con progestina placebo, Premarin (0,625 mg al giorno) e una progestina attiva (Provera® 2,5 mg/al giorno, con continuità, Provera 10 mg/al giorno, ciclicamente o progesterone micronizzato 200 mg/al giorno, ciclicamente); oppure in un gruppo di controllo (CTL) con: estrogeno placebo e progestina placebo. I campioni di siero sono stati ottenuti alla partenza e a 12 mesi da tutti i soggetti.

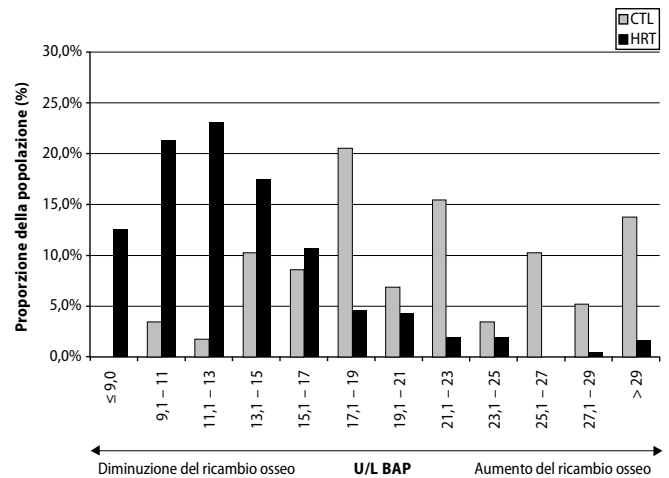
La concentrazione media di BAP alla partenza (± 1DS) ( $20,7 \pm 7,6$  in contrapposizione a  $20,3 \pm 6,8$  U/L,  $p = 0,704$ ) e quella di LSBMD ( $0,97 \pm 0,17$  in contrapposizione a  $0,97 \pm 0,15$  g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,970$ ) erano simili per i gruppi CTL e HRT. Le distribuzioni dei valori BAP alla partenza in HRT e CTL sono descritte nella seguente figura in proporzione rispetto alla popolazione dello studio.

**Distribuzione dei livelli BAP alla partenza**



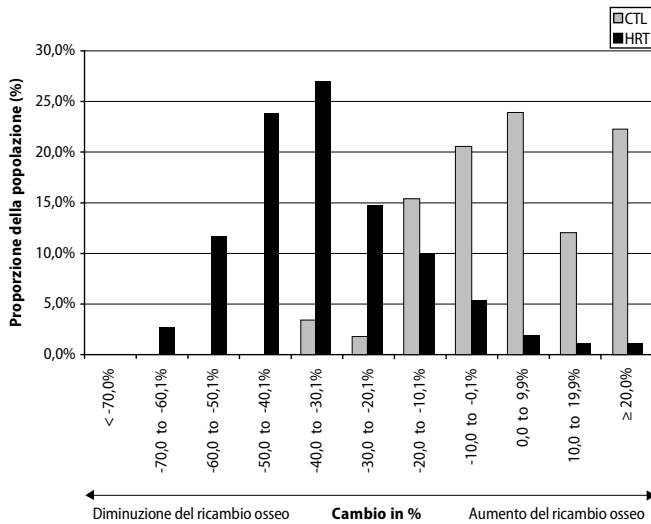
BAP era significativamente più basso per HRT che per CTL a 12 mesi ( $13,3 \pm 5,0$  in contrapposizione a  $21,9 \pm 7,9$  U/L,  $p < 0,00001$ ). Le distribuzioni dei valori di BAP dopo 12 mesi nei gruppi HRT e CTL sono descritte nella seguente figura.

**Distribuzione dei livelli BAP dopo 12 mesi Terapia con estrogeni/progestina (HRT) o placebo (CTL)**

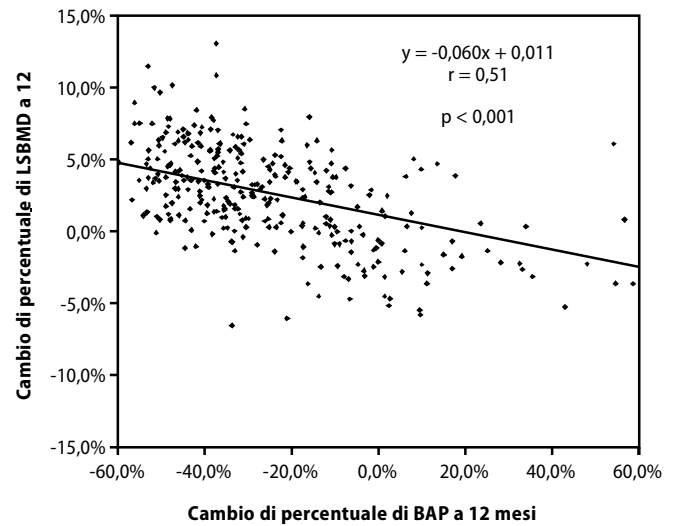


La concentrazione media di BAP (± 1DS) nei soggetti CTL è aumentata leggermente rispetto alla partenza al +9,8% (± 33,2%) a 12 mesi ( $p = 0,08$ ), mentre le concentrazioni di BAP nei soggetti HRT è diminuita dal momento della partenza a -32,4 (± 21,5%) a 12 mesi ( $p < 0,00001$ ). I soggetti del gruppo HRT erano quelli che, più probabilmente dei soggetti CTL, dimostravano delle perdite di BAP oltre il cambio minimo di percentuale<sup>12</sup>, con il 73,3% di individui HRT e il 3,4% di individui CTL, diminuendo di ≥ 25% a 12 mesi. Le distribuzioni del cambio di percentuale rispetto alla partenza nei valori BAP dopo 12 mesi nei gruppi ALN o CTL sono descritte nella seguente figura.

**Distribuzione del cambio di percentuale nei livelli BAP dopo 12 mesi terapia con alendronato (ALN) o calcio (CTL)**



**Studio HRT – Regressione lineare del cambio di % di LSBMD e BAP dalla partenza a 12 mesi**



A 12 mesi, i soggetti del gruppo HRT hanno aumentato la LSBMD se confrontati con quelli del CTL ( $p < 0,00001$ ) come mostrato nella seguente tabella.

**Modifiche in LSBMD (media ± DS)**

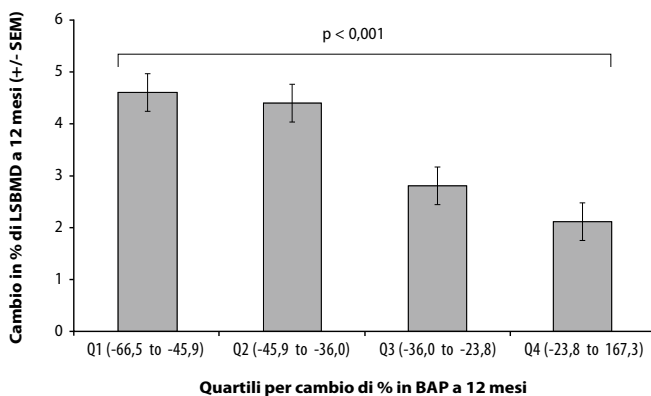
	n	Alla partenza (g/cm <sup>2</sup> )	12 mesi (g/cm <sup>2</sup> )	Δ (%)
CTL	58	0,97 ± 0,17	0,95 ± 0,16	-1,6 ± 2,8
HRT	262	0,97 ± 0,15	1,00 ± 0,15	+3,5 ± 2,8

Questi risultati indicano che il saggio MicroVue BAP è sicuro ed efficace per il monitoraggio dell'effetto anti-riassorbente della terapia sostitutiva dell'ormone in donne in postmenopausa.

**Previsione della risposta scheletrica:**

La seguente figura descrive la diminuzione in % dei valori di BAP dalla partenza a 12 mesi per quartile per il gruppo trattato con trattamento attivo HRT. I soggetti nel quartile più elevato (Q1: massima diminuzione %) hanno mostrato il massimo aumento di LSBMD in risposta a HRT.

**Gruppo HRT – Valori del cambio in % di BAP a 12 mesi stratificati per quartile e corrispondente cambio in % di LSBMD a 12 mesi**



La seguente figura fornisce l'analisi di regressione lineare ( $y = -0,060x + 0,011$ ,  $r = -0,51$ ,  $p < 0,001$ ) del cambio in percentuale dalla partenza a BAP a 12 mesi e il cambio in percentuale dalla partenza della BMD a 12 mesi per tutti i soggetti dello studio (placebo e trattati).

L'analisi della tabella di contingenza ha mostrato che una diminuzione di  $\geq 25\%$  in BAP a 12 mesi era significativamente associata ( $p < 0,0001$ ) a una risposta scheletrica positiva rispetto a HRT (aumento in BMD) a 12 mesi. Gli intervalli di confidenza binomiale dell'85% (approssimazione di second'ordine) per la sensibilità e la specificità dell'uso di una diminuzione del 25% di BAP per la previsione di una risposta a HRT sono:

Sensibilità = 77% (95% CI 75%, 82%);  
 Specificità = 61% (95% CI 41%, 78%).

Questi risultati indicano che il cambio % della concentrazione di BAP può essere utilizzato per prevedere il grado di risposta scheletrica (BMD) al trattamento di HRT.

**ASSISTENZA**

Per servizi al di fuori degli Stati Uniti, contattare il distributore locale. Información adicional de Quidel, nuestros productos y nuestros distribuidores puede encontrarse en nuestra página web [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## BIBLIOGRAFIA

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.

## GLOSSARIO



Consultare le istruzioni per l'uso su CDROM



Finalità d'Uso

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



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



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany