

En enzymimmunanalyse for kvantifisering av ben-spesifikk alkalisk fosfatase (BAP) i humant serum

### Sammendrag av MicroVue™ BAP EIA

#### Forberedelse av Reagenser og Prøver

- Fortynn 10X vaskebuffer 1:10 med destillert eller ikke-ionisert vann

#### Analyseprosedyre

Pipetter 125 µL av analysebuffer i hver mikrotiterbrønn

Pipetter 20 µL av standarder, kontroller og prøver i mikrotiterbrønnene (*Snurr platen forsiktig for å få til en god blanding av prøve og buffer*)

Inkuber i **3 timer ± 10 min.** ved 20 – 28° C

Vask **4 ganger** med 1X vaskebuffer

- Forbered substratløsning (30 – 60 min. før bruk)  
*Tilsett en substrattablett pr. flaske med substratbuffer (Rist kraftig)*

Pipetter 150 µL substratløsning

Inkuber i **30 min. ± 5 min.** ved 20 – 28° C

Pipetter 100 µL stoppløsning

Avles optisk densitet ved 405 nm. Analyser analyseresultatene ved bruk av en kvadratisk kurve med følgende likning:  
 $y = A + Bx + Cx^2$

### **iu** BRUKSOMRÅDE

MicroVue BAP immunanalysen gir et kvantitativt mål på ben-spesifikk alkalisk fosfatase (BAP)-aktivitet i serum som en indikator for osteoblastaktivitet. Måling av BAP er ment å brukes som hjelpemiddel ved:

- Behandling av postmenopausal osteoporose og Paget's sykdom;
- Kontroll av postmenopausale kvinner på hormon- eller bisfosfonat-terapi;
- Forutsigelse av hvordan skjelettet reagerer på hormonterapi hos postmenopausale kvinner.

### SAMMENDRAG OG FORKLARING

Den skjelett-, eller benspesifikke isoformen av alkalisk fosfatase er et tetramerisk glykoprotein som finnes på osteoblastenes celleoverflate.<sup>1</sup> Osteoblaster er de cellene som er ansvarlige for syntese av ny benmatriks og mineraliseringen. BAP-funksjonen er ennå ikke fullt utredet, selv om dens rolle ved mineralisering av skjelettet er fastlagt.<sup>1,2,3</sup>

Ben er kontinuerlig underlagt en metabolsk prosess som kalles bennydannelse.<sup>3,4</sup> Dette innebærer en nedbrytende prosess, benresorpsjon, som er en følge av osteoklast-aktivitet, og en byggende prosess, bendannelse, som følge av osteoblastaktivitet.<sup>3,4</sup> Omforming er nødvendig for å vedlikeholde en generelt sunn benstruktur og er helt avhengig av at benresorpsjon og bennydannelse er i balanse.<sup>3,4</sup> Ved unormal benmetabolisme blir denne prosessen løst forbundet, og hvis resorpsjonen overgår bennydannelsen, blir resultatet et nettotap av ben som kan føre til osteoporose,<sup>3,4</sup> eller til uregelmessig benstruktur som ved Paget's sykdom.<sup>5</sup> Måling av spesifikke biokjemiske markører for denne ombyggingsprosessen gir analytiske data som gjelder hastigheten av ben-metabolismen eller "omsetningen".<sup>3,4</sup>

Osteoporose er en metabolsk bensykdom som karakteriseres ved unormal bennydannelse. Det er en systemisk skjelettsykdom som karakteriseres ved lav benmasse og svekkelse av benvevet på mikroplan, og derav økt risiko for frakturer.<sup>6</sup> Den vanligste form av osteoporose forekommer hos postmenopausale kvinner som følge av østrogenmangel når ovariefunksjonen opphører.<sup>3</sup> Gjenoppbygging av premenstruelle østrogennivåer med hormonbehandling forebygger bentap og osteoporose.<sup>3,6</sup> Østrogener og en type substanser som er kjent som bisfosfonater, er behandlinger som motvirker resorpsjon og kan brukes for å forebygge bentap eller behandle osteoporose.<sup>3,6,7</sup>

Osteoporose kan også utvikle seg som resultat av at man ikke har fått tilstrekkelig benmasse i oppvekstårene, dvs. en aldersrelatert ubalanse i bennydannelsen med for stor benresorpsjon, og en del kliniske tilstander og behandlinger som har medført bentap eller ubalanse i bennydannelsen.<sup>3</sup> Disse omfatter endokrine sykdommer, slik som hypogonadisme, hyperthyroidisme, hyperparathyroidisme, og hyperkortisolisme; nyresvikt; skjelettmetastaser; gastrointestinale sykdommer som er relatert til ernæring og mineral-metabolisme; bindevevssykdommer; myelomatose; kronisk immobilitet, alkoholisme, eller tobakk-bruk; og kronisk heparin- eller kortikosteroidbehandling.<sup>3</sup>

Paget's bensykdom er en fokal lidelse som fører til smerter og skjelettforandringer hos pasienter med symptomer.<sup>5</sup> Paget-lignende lidelser er karakterisert ved benmatriks med høyst unormal struktur som skyldes bennydannelse med overdreven hastighet. Forandringene forekommer hovedsakelig i skalleben, ryggraden, bekkenet og lange ben, og kan føre til frakturer og nevrologisk svekkelse.<sup>5</sup> Etiologien for Paget's sykdom er ukjent, men hypoteser som omfatter genetiske faktorer og virus er overbevisende.<sup>5</sup> Bisfosfonater og kalsitonin brukes for tiden for å bringe det høye biokjemiske aktivitetsnivået ned til normalt nivå, noe som kan føre til gjenopprettelse av normal benstruktur.<sup>9</sup>

Som et kvantitativt mål for en markør av ben-omsetning, gir BAP nyttig informasjon om ben-nydannelse ved osteoporose og Paget's sykdom, og om forandringer i sykdomsaktivitet som følge av behandling som skal motvirke resorpsjon.<sup>10-12</sup> For å utvikle MicroVue BAP-analysen brukte man en antistoffteknologi til å produsere et monoklonalt antistoff som viser spesifisitet for BAP.<sup>10</sup> Spesifisiteten i det monoklonale antistoffet som brukes i analysen, gjør det mulig å kvantifisere BAP-aktivitet i serum på en enkel, praktisk, reproducerbar og direkte måte.

## PROSEDYREPRINSIPP

MicroVue BAP er en immunanalyse i et mikrotiterstrimmel-format som bruker strimler dekket med monoklonalt anti-BAP-antistoff for å fange opp BAP i prøven. Enzymaktiviteten for det kaprede BAP påvises med et pNPP-substrat.

## REAGENSER OG MATERIALE SOM LEVERES

### 96 analyser for ben-spesifikk alkalisk fosfatase

#### MicroVue BAP EIA inneholder følgende:

**A Standarder:** Del 4395 – 4400 0.4 mL, 1 hver

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

**C** BAP rensset fra osteosarkom SAOS-2-celler i en bufferløsning som inneholder magnesiumklorid, sinksulfat, overflateaktivt stoff,

**D** overføringsprotein, blått fargestoff, og natriumazid (0,05 %) som

**E** konserveringsmiddel

**F**

**L Lave/høye kontroller** Del 4401, 4402 0.4 mL, 1 hver

**H** BAP rensset fra osteosarkom SAOS-2-celler i en bufferløsning som inneholder magnesiumklorid, sinksulfat, overflateaktivt stoff, overføringsprotein, blått fargestoff, og natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel

**1 Dekkede strimler** Del 4660 12 hver  
Rensset murint, monoklonalt anti-BAP IgG-antistoff adsorbent på brønnstrimler

**2 Stoppløsning** Del 4702 15 mL  
0.5N NaOH

**3 10X Vaskebuffer** Del 4703 55 mL  
Ikke-ionisert vaskemiddel i en bufferløsning som inneholder natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel

**4 Analysebuffer** Del 4403 27 mL  
En bufferløsning som inneholder magnesiumklorid, sink- sulfat, overflateaktivt stoff, og natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel

**5 Substratbuffer** Del 4404 3 x 10 mL  
En 2-amino-2-metyl-1-propanol-løsning som inneholder HEDTA, magnesiumklorid, sinksulfat, og natriumazid (0,05 %) som konserveringsmiddel

**6 Substrat-tabletter** Del 0012 3 x 20 mg  
p-Nitrofenylfosfat

### NØDVENDIG MATERIALE SOM IKKE LEVERES

- Mikropipetter for 20 µL og 100-300 µL
- Utstyr til å måle væskemengde på 100-300 mL
- Beholder for fortynnet vaskebuffer
- Ikke-ionisert eller destillert vann
- Plateavleser som kan lese optisk densitet ved  $A_{405} > 2.0$
- Programvare for kvadratisk kalibreringskurve

## ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

1. For *in vitro*-diagnostisk bruk.
2. Hånder prøvematerialet som potensielt smittefarlig. Følg alminnelige forsiktighetsregler når du håndterer innholdet i dette settet og alle pasientprøvene.
3. Kast beholdere, og ubrukt innhold i overensstemmelse med gjeldende forskrifter.
4. Bruk reagensene som er levert som en vesentlig del før utløpsdatoen som er angitt på pakningen.
5. Oppbevar analysereagensene slik som anvist.
6. Ikke bruk dekkede strimler hvis det er gått hull på posen.
7. Test alle prøvene i duplikat.
8. Bruk passende verneklær, hansker og beskyttelse for øyne og ansikt, når du håndterer innholdet i dette settet.
9. 0.5 N NaOH er etsende og kan forårsake alvorlige brannskader. Må ikke tas inn eller svelges. Unngå kontakt med hud, øyne eller klær. Hvis dette skjer, vask med vann. Hvis det er tatt inn eller svelget, tilkall lege.
10. Natriumazid brukes som konserveringsmiddel. Tilfeldig kontakt med eller inntak av buffere som inneholder natriumazid kan forårsake irritasjon på huden, i øynene, eller i munnen. Bruk bufferne til det de er ment for og, unngå kontakt med syrer. Natriumazid kan reagere med bly- og kobberer og danne høyeksplosive metallazider. Når de kastes, skal det spyles med store mengder vann for å forebygge dannelse av azider.
11. Substratbufferen inneholder 2-amino-2-metyl-1-propanol og kan forårsake irritasjon i øynene og/eller huden ved langvarig kontakt. Hvis man har fått det på seg, vaskes det vekk umiddelbart med såpe og vann.
12. Vi anbefaler at man bruker multikanalpipetter eller pipetter for flergangsbruk for å sikre pipettering av reagenser i tide.
13. For å oppnå eksakt måling av prøver, skal prøver og standarder tilsettes nøyaktig. Pipetter forsiktig, og bare med kalibrert utstyr.
14. Fortynn prøver som er større enn 140 E/L, i analysebuffer og test om igjen. Inkluder fortynningsfaktoren i den endelige beregningen.
15. Denne analysen kan gjennomføres med alle godkjente vaskemetoder.

## FORBEREDELSE AV REAGENSER

La alle reagenser og det materiale som skal brukes i analysen, komme opp i 20-28°C før bruk. Etter å ha tatt ut de nødvendige reagensene og øvrig materiale, legges det ubrukte utstyret tilbake for oppbevaring ved 2-8°C.

### Dekkede strimler

Ta Stripwell-rammen og det nødvendige antall dekkede strimler ut av posen (Se avsnittet om ANALYSEPROSEDYRE). Sørg for at posen som inneholder ubrukte strimler, er fullstendig forseglest.

### Vaskebuffer

Forbered nødvendig mengde av 1X vaskebuffer (se tabell) ved å fortynne 10X konsentrert vaskebuffer 1:10 med ikke-ionisert vann. Oppbevares ved 20-28°C. Bruk 1X vaskebuffer innen 21 dager etter at den er klargjort.

### Substratarbeidsløsning

Forbered substratarbeidsløsning innen 1 time før den skal brukes. Legg en substrat-tablett i hver substratbufferflaske 20-28°C (se tabell). La tablett(e) oppløse seg i 30-60 minutter. Rist flasken(e) kraftig for å gjøre blandingen fullstendig. Kast den gjenværende substratarbeidsløsningen etter bruk.

## OPPBEVARING

Oppbevar settet ved 2-8°C. Må ikke fryses.

Oppbevar ubrukte reagenser ved 2-8°C. La reagensene komme opp i 20-28°C før bruk.

Oppbevar 1X vaskebuffer (10X fortynnet) ved 20-28°C.

## INNSAMLING AV PRØVER OG OPPBEVARING

Ta serum ved bruk av standard venepunktur.

Prøvematerialet skal tas uten antikoagulantia og på en slik måte at man unngår hemolyse. La blodet koagulere og skill serum fra med sentrifugering. Serum kan oppbevares i 5 dager ved 2-8°C, ved ≤ -40°C, i 12 måneder, eller ved ≤ -80°C, i 36 måneder. Ikke frys og tin prøvene mer enn 3 ganger. Serum "fra koagelet", serum fra serumseparatorrør, Na-heparin-plasma, og Li-heparin-plasma gir hovedsakelig ekvivalente resultater. Det anbefales at man ikke bruker chelaterende stoffer, slik som EDTA eller citrat, når man forbereder plasmaprøver.

## ANALYSEPROSEDYRE

Les hele pakningsvedlegget før du begynner med analysen.

Se FORBEREDELSE AV REAGENSER før du fortsetter.

Bestem mengde av hver reagens som er nødvendig for det antall strimler som skal brukes.

# strimler	4	6	8	12
# prøver (testet i duplikat)	8	16	24	40
Substrat (flaske)	1	1	2*	2*
1X vaskebuffer (mL)	100	150	200	300

\* Hvis mer enn en flaske eller ett hetteglass skal brukes, slås innholdet sammen og blandes før bruk.

## Inkubasjon av prøver

1. Ta Stripwell-rammen og det nødvendige antall dekkede strimler ut av posen (se tabell) like før de skal brukes. Sørg for at den forseglede posen som inneholder ubrukte strimler er fullstendig forseglest igjen.
2. Legg det ønskede antall dekkede strimler i Stripwell-rammen. Merk strimlene for å unngå sammenblanding, hvis man ved et uhell tar noen ut av Stripwell-rammen.
3. Tilsett 125 µL analysebuffer i hver brønn.
4. Tilsett 20 µL standard, kontroll eller prøve i hver brønn. Ikke bland det med analysebuffer ved gjentatt pipettering. Dette trinnet må være ferdig innen 30 minutter. **Snurr strimlene forsiktig for å sikre en jevn blanding av prøve og buffer.**
5. Inkuber i 3 timer (± 10 minutter) ved 20-28°C.
6. Forbered substratarbeidsløsningen innen 1 time før bruk. Legg en substrat-tablett i hver flaske med substratbuffer 20-28°C (se tabell). La tablett(e) oppløse seg i 30-60 minutter. Rist flasken(e) kraftig for å gjøre blandingen fullstendig.

## Vask

7. Forbered nødvendig mengde av 1X vaskebuffer (se tabell) ved å fortynne 10X vaskebuffer 1:10 med ikke-ionisert vann. Oppbevares ved 20-28°C. Bruk 1X vaskebuffer innen 21 dager etter at den er klargjort.
8. Snu strimlene opp ned med hendene for å tømme dem. Tilsett minst 250 µL 1X vaskebuffer i hver brønn, og snu dem opp ned med hendene for å tømme strimlene. Gjenta dette tre ganger, slik at det blir totalt fire vaskeomganger. Tørk strimlene kraftig på tørkepapir etter siste vask.

## Inkubasjon av substrat

9. Tilsett 150 µL av substratarbeidsløsning i hver brønn. Kast gjenværende substratarbeidsløsning etter bruk.
10. Inkuber i 30 minutter (± 5 minutter) ved 20-28°C.

## Stopp/Avles

11. Tilsett 100 µL stoppløsning i hver brønn. Tilsett stoppløsningen i samme rekkefølge og med samme tidsintervaller som for substratløsningen.
12. Les av optisk densitet ved 405 nm. Sørg for at det ikke er store bobler i brønnene og at undersiden av strimlene er ren. Strimlene bør avleses innen **15 minutter** etter tilsetning av stoppløsning.
13. For å analysere resultatene i MicroVue BAP-analysen **må** man bruke en programvare for kvantifisering med en likning for en kvadratisk kalibreringskurve.

$$\text{Likning: } y = A + Bx + Cx^2$$

## KVALITETSKONTROLL

Analysesertifikatet for dette settet er spesifikt for dette varepartiet og skal brukes for å verifisere at de resultatene som er oppnådd i ditt laboratorium, er like de man har fått ved Quidel. Verdiene for optisk densitet foreligger og skal bare brukes som retningslinjer. Resultatene som er oppnådd i ditt laboratorium kan avvike.

Verdiene for kvalitetskontroll foreligger. Kontrollverdiene er beregnet brukt for å verifisere validiteten av kurven og prøveresultatene. Hvert laboratorium bør sette opp sine egne parametere for akseptable analysegrenser. Hvis kontrollverdiene IKKE er innen ditt laboratoriums akseptable grenser, bør analyseresultatene anses tvilsomme, og prøvene bør gjentas.

Hvis den optiske densitet for MicroVue BAP-standard F er mindre enn 1.0, bør resultatene anses tvilsomme og prøvene skal gjøres om igjen.

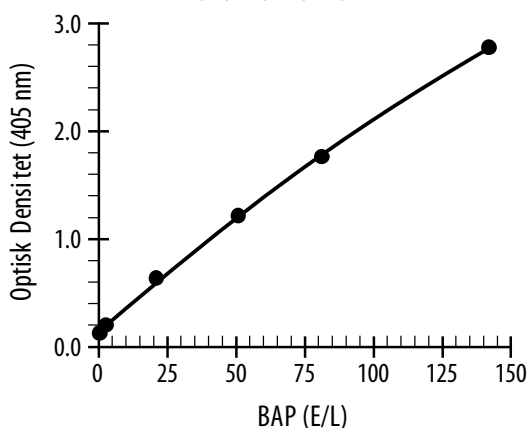
## FORTOLKNING AV RESULTATER

Prøveresultater er uttrykt i E/L og må ikke korrigeres for fortynning (hvis ikke prøven ble fortynnet før analysen fant sted).

I MicroVue BAP-analysen representerer 1 Enhet 1  $\mu\text{mol}$  av pNPP hydrolysert pr. minutt ved 25°C i 2-amino-2-metyl-1-propanol-buffer.

### Representativ standardkurve

Standard BAP-nivåer: 0, 2, 20, 50, 80, 140 E/L



## PROSEDYRENS BEGRENSENINGER

### HAMA-interferens

Noen personer har antistoffer mot muse-antistoffer (HAMA), som kan forårsake interferens i immunanalyser som bruker antistoffer fra mus. Spesielt er det blitt rapportert at serumprøver fra pasienter som har vært under behandling eller har gjennomgått diagnostiske prosedyrer som har inkludert infusjon av monoklonale muse-antistoffer, kan gi feilaktige resultater. Derfor bør resultater fra MicroVue BAP for slike pasienter bare brukes sammen med resultater fra noen andre diagnostiske prosedyrer og med informasjon som er tilgjengelig fra klinisk evaluering av pasienten.

Prøver med signifikant forhøyet aktivitet av lever alkalisk fosfatase kan forårsake abnormt forhøyede resultater i MicroVue BAP-analysen.

Pasienter som har Paget's sykdom i mindre grad, kan ha nivåer av benspesifikk alkalisk fosfatase, som ligger innenfor referanseområdet for MicroVue BAP.

## PRØVE-VERDIER

Referanseområdet for BAP er bestemt for normale menn over 25 år (n = 126), normale premenopausale kvinner mellom 25 og 44 år gamle (n = 178), og normale postmenopausale kvinner (n = 107). Med tanke på å fastsette referanseområder, ble normale personer definert som:

- Stort sett friske, uten skjelettsykdommer, endokrine eller kroniske lidelser
- Regelmessige menstruasjonssyklus (premenopausale kvinner)
- Ikke gravide eller ammende (kvinner)
- Ikke daglig bruker noen medisiner som man vet påvirker benmetabolismen

Verdier kan påvirkes av faktorer som lav østrogenproduksjon, lavt kalsiuminntak eller lav fysisk aktivitet.<sup>8</sup> Østrogenmangel hos postmenopausale kvinner kan føre til forhøyet benomsetning.<sup>3,4</sup> Hvert laboratorium bør sette opp sitt eget referanseområde for normalverdier.

Grensene er uttrykt som ikke-parametriske referanseintervaller (90% CI).

	Alder (År)	Område (E/L)	Median	
Kvinner	25 - 44	Premenopausale	11.6 - 29.6	18.3
Kvinner	≥ 45	Postmenopausale	14.2 - 42.7	25.0
Menn	≥ 25		15.0 - 41.3	23.2

## KARAKTERISTIKA FOR YTEEVNEN

### Antistoffspesifikasjoner

Ben-spesifikt alkalisk fosfatase antistoff har en selektiv og høy affinitet for den ben-spesifikke alkaliske fosfatase isoformen, og lav kryss-reaktivitet med alkalisk fosfatase i lever, og ubetydelig binding til isoenzymer i tarm og placenta.

AP Isoenzymer	% Reactivity
Ben	100
Lever	3 - 8
Placental	0
Tarm	0.4

### Sensitivitet

Den laveste grense for påvisning med MicroVue BAP-analysen er 0.7 E/L, som er bestemt ved den øverste 3 SD-grense i en null-standard presisjons-studie.

### Gjenoppsett - Gjenoppsett av spisspotensial

Gjenoppsett av spisspotensial ble bestemt ved tilsetning av en kjent mengde rensert BAP i serumprøver med forskjellige nivåer av endogen BAP. Man får typiske resultater etter "spiking" av serumprøver med lave, middels, og høye konsentrasjoner av BAP som analyseres i triplikat.

Endogen (U/L)	Tilsatt (E/L)	Observerte (E/L)	Gjenoppsett (%)
13.4	15.7	29.1	99
17.6	37.5	55.3	99
27.2	57.2	88.1	106

## Gjenoppretting - Linearitet

Presisjon i samme analyse ble bestemt med  $\geq 21$  kopier av 3 prøver på 3 plater fra hver enkelt av 3 partsett (totalt 9 plater). Presisjon mellom analyser ble bestemt med 3 prøveanalyser på 6 separate plater fra hver enkelt av 3 partsett (totalt 18 plater). Typiske resultater vises nedenfor.

Prøve	Fortynningsfaktor	Observert (E/L)	Forventet (E/L)	Gjenoppretting (%)
1	ren	108.5	-	-
	1:2	51.1	54.2	94
	1:4	25.8	27.1	99
	1:6	18.0	18.1	99
2	ren	39.1	-	-
	1:2	20.1	19.5	103
	1:4	10.3	9.8	105
	1:6	6.7	6.5	103
3	ren	58.4	-	-
	1:2	29.9	29.2	102
	1:4	15.7	14.6	108
	1:6	9.7	9.7	100

## Presisjon

Presisjon i samme analyse ble bestemt med  $\geq 21$  kopier av 3 prøver på 3 plater fra hver enkelt av 3 partsett (totalt 9 plater). Presisjon mellom analyser ble bestemt med 3 prøveanalyser på 6 separate plater fra hver enkelt av 3 partsett (totalt 18 plater). Typiske resultater vises nedenfor.

BAP (E/L BAP)	I samme analyse <sup>1</sup> C.V. (%)	Mellom-analyser <sup>2</sup> C.V. (%)
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 omganger

## Interfererende substanser

Følgende substanser i de spesifiserte konsentrasjonene, og ble funnet ikke å interferere med analysen.

Substans	Konsentrasjon
Hemoglobin	500 mg/dL
Bilirubin	25 mg/dL
Triglycider	1420 mg/dL
Total Protein	6.0 g/dL †
Total Protein	15.6 g/dL †
Total Protein	6.0 g/dL ‡
Total Protein	15.6 g/dL ‡

† Protein med vann

‡ Protein med BAP (BAP konsentrasjon = 43.6 U/L)

## Preparatinterferenser

Preparater i forskjellige konsentrasjoner ble tilsatt tre separate serumpools som inneholdt ca. 35, 70, og 105 E/L BAP og analysert i triplikat. Preparatene og de høyeste konsentrasjonene som ble testet, var:

Substans	Høyest konsentrasjon
Etidronat	350 µg/mL
Østrogen	100 µg/mL
Ibuprofen	150 µg/mL
Acetaminofen	350 µg/mL
Aspirin	350 µg/mL
Calcitonin – humant	80 µg/mL
Calcitonin – laks	80 µg/mL
Kalsium	500 µg/mL
Norethindron/ethynilestradiol blanding (oralt prevensjonsmiddel)	3 mg/mL
Vitamin D	400 IU/mL

## Nøyaktighet

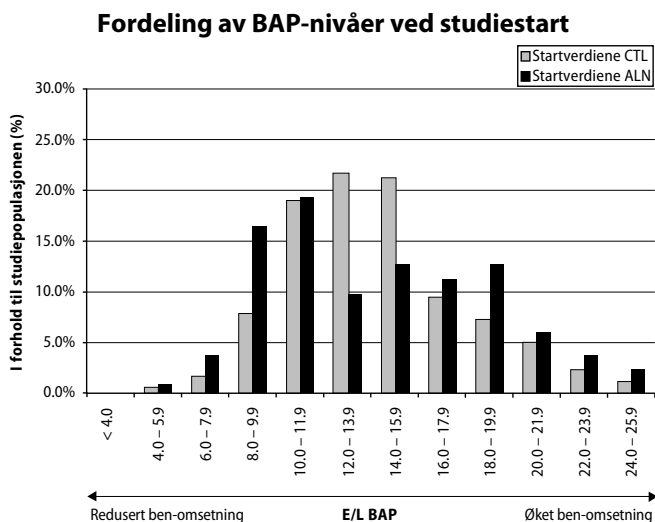
Sammenlignende studier ble utført for å vurdere korrelasjoner mellom målinger av serum ben-spesifikk alkalisk fosfatase (BAP) som man hadde fått med MicroVue BAP-analysen, med de resultatene som man hadde fått ved bruk av tre for tiden markedsførte metoder for måling av total alkalisk fosfatase (TAP) eller BAP. Studiene ble utført ved et uavhengig, klinisk forskningscenter som brukte sera fra 114 pasienter med Paget's sykdom og 464 friske personer. Den første metoden man sammenlignet med, var en kolorimetrisk teknikk for måling av TAP. Korrelasjonskoeffisienten (r) som man fikk mellom den kolorimetriske metoden og MicroVue BAP-analysen, var 0.99. Den andre metoden man sammenlignet med, var en elektroforesemetode for bestemmelse av BAP isoenzymnivåer (r = 0.99). Den tredje metoden man sammenlignet med, var en immunradiometrianalyse for måling av BAP (r = 0.99). Av de 114 pasientene med Paget's sykdom hadde 101 verdier som var større enn øverste grense i referanseområdet for MicroVue BAP-analysen. Tretten pasienter hadde verdier som var mindre enn øverste grense i referanseområdet.

## KLINISKE STUDIER

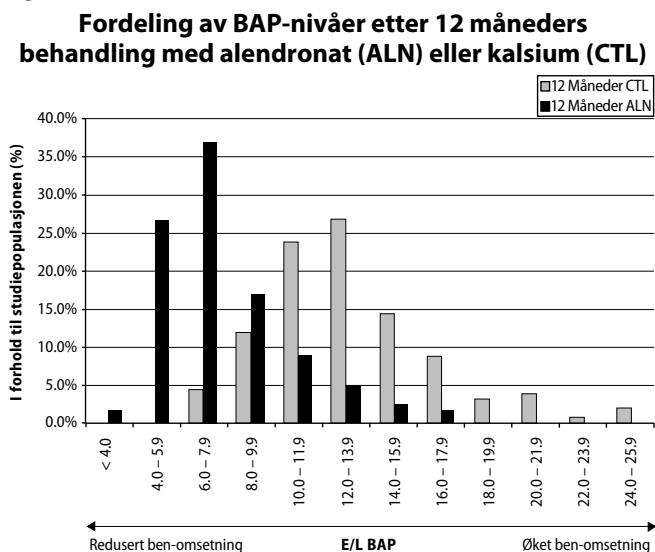
### Bruk av MicroVue BAP for å undersøke effekten av behandling mot bennedbrytning ved osteoporosis

En multisenter-, randomisert og kontrollert studie ble vellykket gjennomført for å se på sikkerhet og effekt av MicroVue BAP-analysens kapasitet for å undersøke endringer i serum BAP-konsentrasjoner forbundet med amino-bisfosfonat (alendronate) behandling. Pasientene som var med i en større studie for å undersøke effekten av alendronat til behandling av osteoporose,<sup>7</sup> var postmenopausale kvinner i alderen 45 til 84 år (gjennomsnitt  $64 \pm 7$  år), som fikk diagnosen osteoporose (basert på klinisk undersøkelse eller som i utgangspunktet hadde en benmineralitet i lumbalregionen [LSBMD] som var mer enn 2.5 standardavvik under gjennomsnittet for voksne premenopausale kvinner). Ved studiens begynnelse ble egnede pasienter randomisert til å få enten 10 mg alendronat og 500 mg kalsium daglig (ALN) eller placebo og 500 mg kalsium daglig (CTL). Serumprøver av alle pasientene ble tatt før start, 3, 6 og 12 måneder.

Gjennomsnittlig ( $\pm$  1SD) BAP-konsentrasjon før start var ( $14.6 \pm 5.4$  vs.  $14.6 \pm 4.6$ ,  $p = 0.900$ ) og LSBMD ( $0.74 \pm 0.10$  vs.  $0.75 \pm 0.09$ ,  $p = 0.751$ ) hadde like verdier for ALN og CTL. Fordelingen av startverdiene for BAP i ALN og CTL er vist i følgende figur i forhold til studiepopulasjonen.



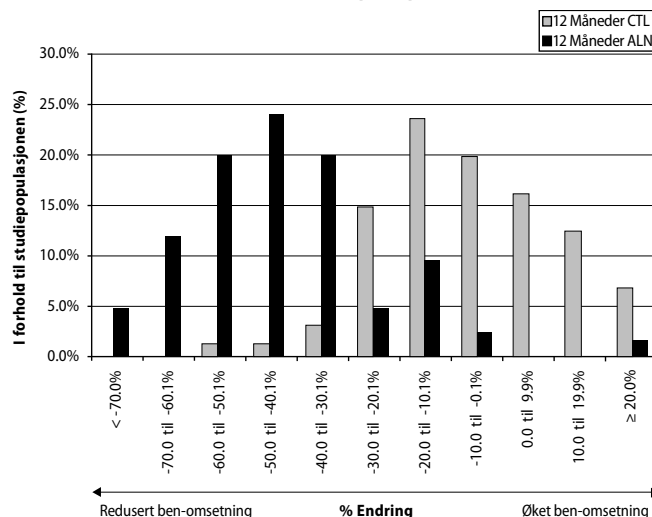
BAP var signifikant lavere for ALN enn CTL ved 3 ( $9.6 \pm 3.5$  vs.  $13.4 \pm 4.0$ ,  $p < 0.00001$ ), 6 ( $8.0 \pm 3.0$  vs.  $13.2 \pm 3.8$ ,  $p < 0.00001$ ), og 12 måneder ( $7.8 \pm 2.6$  vs.  $13.3 \pm 3.9$ ,  $p < 0.00001$ ). Fordelingen av BAP-verdiene etter 12 måneder i ALN- og CTL-gruppene er vist i følgende figur.



Gjennomsnittlig ( $\pm$  1SD) BAP-konsentrasjon hos CTL-pasientene falt moderat fra start, til  $-5.4\%$  ( $\pm 19.1\%$ ) ved 12 måneder ( $p = 0.00004$ ), noe som kan gjenspeile begrenset effekt av kalsium.<sup>13</sup>

Gjennomsnittlige BAP-konsentrasjoner hos ALN-pasientene falt  $30.5 \pm 24.6\%$  ved 3 måneder,  $42.8 \pm 17.3\%$  ved 6 måneder, og  $42.2 \pm 19.2\%$  ved 12 måneder. Det var mer sannsynlig for pasientene i ALN-gruppen, enn for CTL-pasientene å vise reduksjoner av BAP som oversteg minimum prosentvis endring<sup>14</sup> med 68.5%, 83.9%, og 86.1% av ALN- og 9.5%, 15.9% og 9.0% av CTL-pasientene med reduksjon på  $\geq 25\%$  ved tidspunktene 3, 6, og 12 måneder. Fordeling av prosentvis endring av BAP-verdier i ALN- og CTL-gruppene etter 12 måneder, er vist i følgende figur.

### Fordeling av prosentvis forandring i BAP-nivåer etter 12 måneders behandling med alendronat (ALN) eller kalsium (CTL)



Etter 12 måneder hadde pasienter i ALN-gruppen øket LSBMD, sammenlignet med pasienter i CTL-gruppen ( $p < 0.00001$ ) som det fremgår av følgende tabell.

#### Endring i LSBMD (gjennomsnittlig $\pm$ SD)

	n	Start (g/cm²)	12 måneder (g/cm²)	$\Delta$ (%)
CTL	159	$0.75 \pm 0.09$	$0.74 \pm 0.09$	$-0.6 \pm 3.4$
ALN	121	$0.74 \pm 0.10$	$0.79 \pm 0.10$	$5.5 \pm 4.1$

Disse resultatene viser at MicroVue BAP-analysen er sikker og effektiv for å påvise effekten av amino-bisfosfonat (alendronat)-behandling for å hemme benresorpsjon hos osteoporosepasienter.

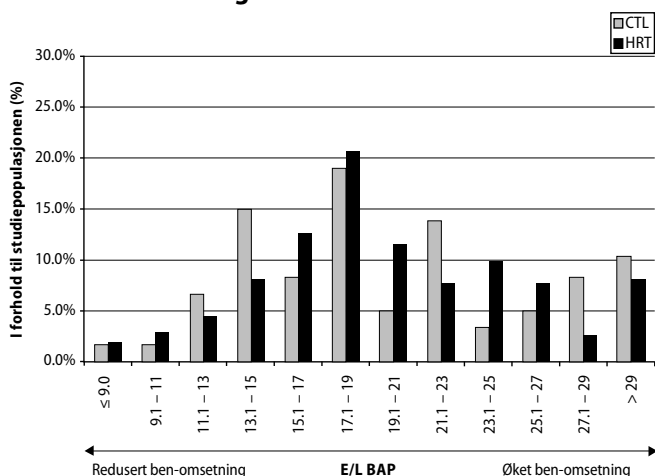
#### Bruk av MicroVue BAP til undersøkelse av hormonbehandling for å hemme benresorpsjon og til å forutsi skjelettreaksjoner (Bentetthet) hos postmenopausale kvinner

##### Kontrollert behandling:

En multisenter-, randomisert og kontrollert studie ble vellykket gjennomført for å se på sikkerhet og effekt av MicroVue BAP-analysens kapasitet for å undersøke endringer i serum BAP-konsentrasjoner forbundet med østrogen/ progestin-terapi. Øket benomsetning og signifikant bentap er ofte forbundet med postmenopausal østrogenmangel. Østrogen-behandling har vist seg å være effektiv når det gjelder å redusere benomsetning og ta vare på eksisterende benmasse.<sup>3,6</sup> Pasientene var postmenopausale kvinner i alderen 45 til 64 år (gjennomsnittlig  $56 \pm 4$  år), med naturlig eller kirurgisk menopause i løpet av de 10 siste årene. Ved studiestart ble egnede pasienter randomisert, enten til en gruppe for aktiv behandling (HRT): Premarin® (0.625 mg daglig) med progestin-placebo, Premarin (0.625 mg daglig) og aktiv progestin (Provera® 2.5 mg/dag kontinuerlig, Provera 10 mg/dag, syklisk, eller mikronisert progesteron 200 mg/dag, syklisk); eller til kontrollgruppen (CTL): østrogen-placebo og progestin-placebo. Det ble tatt serumprøver av alle pasientene ved start og etter 12 måneder.

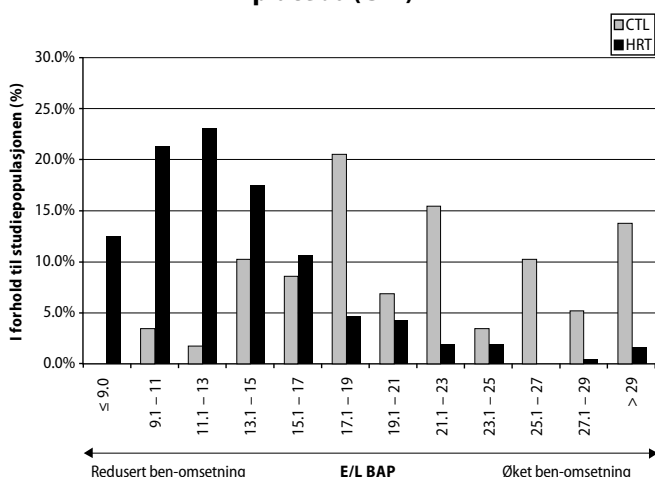
Gjennomsnittlig ( $\pm 1SD$ ) BAP-konsentrasjon ( $20.7 \pm 7.6$  vs.  $20.3 \pm 6.8$  U/L,  $p = 0.704$ ) og LSBMD ( $0.97 \pm 0.17$  vs.  $0.97 \pm 0.15$  g/cm<sup>2</sup>,  $p = 0.970$ ) ved start var lik for CTL og HRT. Fordelingen av BAP-verdiene ved start for HRT og CTL i forhold til studiepopulasjonen, vises i følgende figur.

### Fordeling av BAP-nivåer ved start



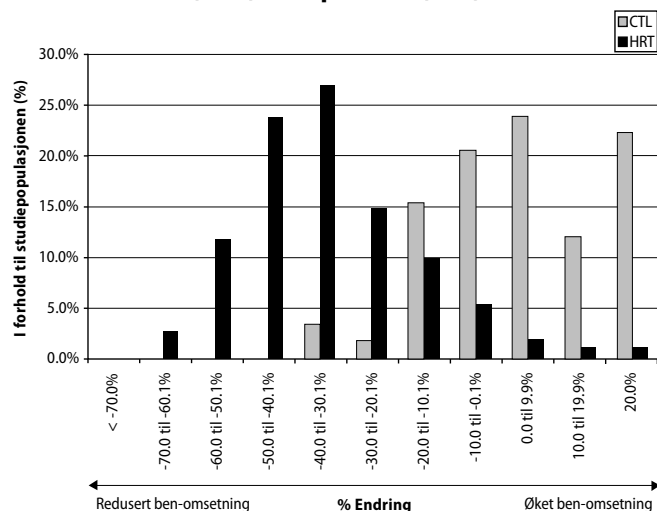
BAP var signifikant lavere for HRT enn for CTL ved 12 måneder ( $13.3 \pm 5.0$  vs.  $21.9 \pm 7.9$  U/L,  $p < 0.00001$ ). Fordeling av BAP-verdier i HRT- og CTL-gruppene etter 12 måneder vises i følgende figur.

### Fordeling av BAP-nivåer etter 12 måneders behandling med østrogen/progestin (HRT) eller placebo (CTL)



Den gjennomsnittlige ( $\pm 1SD$ ) BAP-konsentrasjonen hos CTL-pasientene økte svakt fra start til  $+9.8\%$  ( $\pm 33.2\%$ ) ved 12 måneder ( $p = 0.08$ ), mens BAP-konsentrasjoner hos HRT-pasientene falt fra start til  $-32.4\%$  ( $\pm 21.5\%$ ) ved 12 måneder ( $p < 0.00001$ ). Det var mer sannsynlig for pasientene i HRT-gruppen, enn for pasientene i CTL-gruppen å vise reduksjoner av BAP som oversteg minimum prosentendring<sup>12</sup> med 73.3% av HRT- og 3.4% av CTL-pasientene, med reduksjon på  $\geq 25\%$  etter 12 måneder. Fordelingen av prosentvis endring av BAP-verdier i HRT- og CTL-gruppene fra start fra start til 12 måneder vises i følgende figur.

### Fordeling av prosentvis forandring av BAP-nivåer etter 12 måneders behandling med østrogen/progestin (HRT) eller placebo (CTL)



Etter 12 måneder hadde pasientene i HRT-gruppen øket LSBMD sammenlignet med CTL-gruppen ( $p < 0.00001$ ), slik som vist i følgende tabell.

### Endringer i LSBMD (Gjennomsnittlig $\pm SD$ )

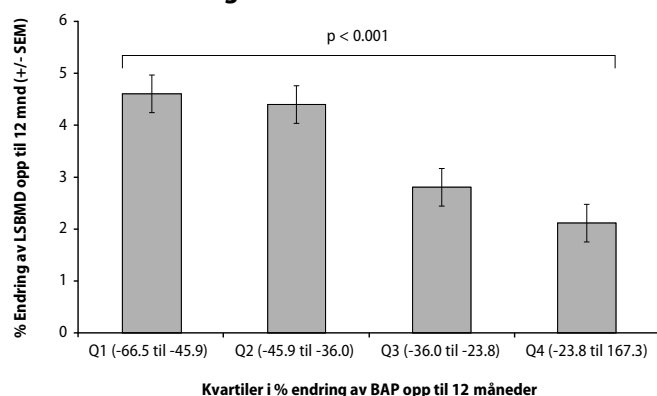
	n	Start (g/cm <sup>2</sup> )	12 måneder (g/cm <sup>2</sup> )	$\Delta$ (%)
CTL	58	$0.97 \pm 0.17$	$0.95 \pm 0.16$	$-1.6 \pm 2.8$
HRT	262	$0.97 \pm 0.15$	$1.00 \pm 0.15$	$+3.5 \pm 2.8$

Disse resultatene indikerer at MicroVue BAP-analysen er sikker og effektiv når det gjelder å vurdere effekten av hormonbehandling for å hemme benresorpsjon hos postmenopausale kvinner.

### Forutsi skjelett-reaksjon:

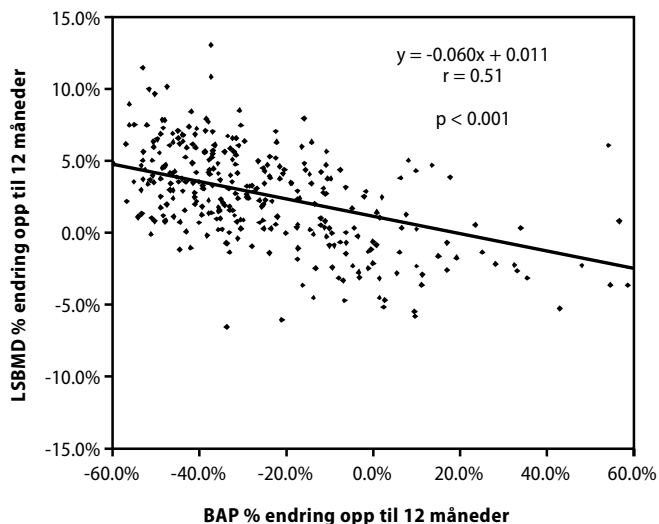
Følgende figur viser %-reduksjon i BAP-verdier fra start til 12 måneder i kvartiler for HRT-gruppen. Pasienter med høyeste kvartil (Q1: størst %- reduksjon) viste største økning av LSBMD som svar på HRT.

### HRT-gruppe - verdier i %-forandring av BAP opp til 12 måneder stratifisert med kvartiler og tilsvarende %-endring av LSBMD ved 12 måneder



Følgende figur viser den lineære regresjonsanalysen ( $y = -0.060x + 0.011$ ,  $r = -0.51$ ,  $p < 0.001$ ) i prosentvis forandring av BAP fra start til 12 måneder og prosentvis endring i fra start til 12 måneder for alle pasientene i studien (placebo og behandlede).

### HRT-studie - lineær regresjon i %-endring av LSBMD og BAP fra start til 12 måneder



Analyse av tilfeldigheter viste at en  $\geq 25\%$  reduksjon av BAP ved 12 måneder var signifikant forbundet ( $p < 0.0001$ ) med en positiv skjelettreaksjon på HRT (økning i BMD) ved 12 måneder. De binominelle (annengrads beregning) 85% konfidensintervallene for sensitivitet og spesifisitet ved å bruke en 25% reduksjon av BAP for å forutsi reaksjon på HRT er:

Sensitivitet = 77% (95% CI 75%, 82%);

Spesifisitet = 61% (95% CI 41%, 78%).

Disse resultatene indikerer at % forandring av BAP-konsentrasjon kan brukes til å forutsi i hvilken grad skjelettet reagerer (BMD) på HRT-behandling.

### ASSISTANSE

For service utenfor USA, vennligst ta kontakt med din lokale forhandler. Ytterligere informasjon om Quidel, våre produkter og våre fordelere kan bli funnet på vår website på [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## REFERANSER

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



Konsulter brukanvisnier på CDROM



Bruksområde

---

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