

Um imunoenensaio enzimático para medir a fosfatase alcalina específica do osso (BAP) no soro humano

MicroVue™ BAP EIA Sumário

Preparação do Reagent e da Amostra

- Diluir la tampão de lavagem 10X concentrado na proporção de 1:10 com água desionizada.

Procedimento de Ensaio

Adicionar 125 µL de Tampão de Análise a cada poço

Adicionar 20 µL de Padrões, Controlos e Amostras a cada poço. *(Agitar suavemente as tiras para assegurar a mistura da amostra e do tampão.)*

Incubar 3 horas ± 10 minutos à 20 – 28°C

Lavar 4 vezes com Tampão de Lavagem 1X

- Preparar a Solução de Substrato (30 – 60 min antes do uso) Colocar um Comprimido de Substrato em cada frasco de Tampão de Substrato (agitar vigorosamente)

Adicionar 150 µL de Solução de Substrato

Incubar 30 ± 5 minutos à 20 – 28°C

Adicionar 100 µL de Solução de Paragem

Lê Densidade Óptica em 405 nm. Analise os resultados do assay usando um ajuste quadrático da curva
 $y = A + Bx + Cx^2$

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A isoforma esquelética, ou específica do osso, da fosfatase alcalina é uma glicoproteína tetramérica que se encontra na superfície das células dos osteoblastos.¹ Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese da nova matriz óssea e pela sua mineralização. A função da BAP não foi ainda completamente elucidada, embora o seu papel na mineralização óssea tenha sido confirmado.^{1,2,3}

O osso está constantemente sujeito a um processo metabólico designado por renovação.^{3,4} Tal inclui um processo de degradação, reabsorção óssea, mediado pela acção dos osteoclastos, e um processo de construção, formação óssea, mediado pela acção dos osteoblastos.^{3,4} A renovação é necessária para a manutenção e saúde geral do osso e está bem interligada; ou seja, a reabsorção e a formação estão em equilíbrio.^{3,4} Nos estados anormais do metabolismo ósseo este processo deixa de estar interligado e, quando a reabsorção supera a formação, o resultado é uma perda líquida de osso que pode conduzir à osteoporose^{3,4} ou a perturbações do tecido ósseo nas lesões pagéticas.⁵ A medição de marcadores bioquímicos específicos destes eventos de renovação proporciona dados analíticos sobre a velocidade do metabolismo ósseo ou “renovação”.^{3,4}

A osteoporose é uma doença metabólica óssea caracterizada por uma renovação óssea anómala. É uma doença sistémica do esqueleto caracterizada por uma baixa massa óssea e deterioração microarquitónica do tecido ósseo, com o consequente aumento da susceptibilidade às fracturas.⁶ O tipo mais frequente de osteoporose ocorre nas mulheres após a menopausa como resultado da deficiência de estrogénios produzida pela cessação da função dos ovários.³ A reposição dos níveis de estrogénios anteriores à menopausa pela terapêutica de substituição impede a perda óssea e a osteoporose.^{3,6} A utilização de estrogénios e de uma classe de compostos conhecidos como bifosfonatos constitui uma terapêutica que inibe a reabsorção e que pode ser utilizada para impedir a perda óssea ou tratar a osteoporose.^{3,6,7}

A osteoporose pode também resultar do facto de não ser atingida uma massa óssea máxima durante os anos de crescimento, de um desequilíbrio da renovação óssea relacionado com a idade, com um excesso líquido de reabsorção, e de uma série de situações clínicas e terapêuticas que induzem a perda óssea ou desequilíbrios na renovação óssea.³ Estas incluem doenças endócrinas como o hipogonadismo, o hipertiroidismo, o hiperparatiroidismo e o hipercortisolismo; insuficiência renal; cancro com metástases ósseas; doenças gastrointestinais relacionadas com a nutrição e o metabolismo dos minerais; doenças do tecido conjuntivo; mieloma múltiplo; imobilização crónica, alcoolismo ou tabagismo; e terapêutica crónica com heparina ou corticosteróides.³

FINALIDADE

O imunoenensaio MicroVue BAP proporciona uma medida quantitativa da actividade da fosfatase alcalina específica do osso (BAP) no soro como um indicador da actividade osteoblástica. A medição da BAP destina-se a ser utilizada como auxiliar nas seguintes situações:

- tratamento da osteoporose pós-menopausa e da doença de Paget;
- monitorização das mulheres depois da menopausa submetidas a terapêutica hormonal ou com bifosfonatos;
- previsão da resposta óssea à terapêutica hormonal nas mulheres depois da menopausa.

A doença óssea de Paget é uma perturbação focal associada a dores e a deformações ósseas nos doentes sintomáticos.⁵ As lesões pagéticas caracterizam-se por uma matriz óssea de estrutura altamente anómala resultante da velocidade excessiva da actividade de renovação. As lesões ocorrem predominantemente no crânio, na coluna, na bacia e nos ossos compridos, podendo provocar fracturas e lesões a nível neurológico.⁵ A etiologia da doença de Paget é desconhecida, mas as hipóteses que envolvem factores genéticos e virais são convincentes.⁵ Os bifosfonatos e a calcitonina são actualmente utilizados para reduzir a elevada taxa de actividade bioquímica aos níveis normais, permitindo a reposição da estrutura óssea normal.⁹

Como medida quantitativa de um marcador da renovação óssea, a BAP proporciona informações úteis sobre a renovação óssea na osteoporose e na doença de Paget, e sobre as alterações na actividade da doença produzidas pela terapêutica que inibe a reabsorção.¹⁰⁻¹² Para o ensaio MicroVue BAP recorreu-se a uma tecnologia de anticorpos para produzir um anticorpo monoclonal que demonstra especificidade pela BAP.¹⁰ A especificidade do anticorpo monoclonal utilizado no ensaio permite a quantificação simples, conveniente, reprodutível e directa da actividade da BAP no soro.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O ensaio MicroVue BAP é um imunoensaio num formato de tira de microtitulação que utiliza um anticorpo monoclonal anti-BAP revestido na tira para captar a BAP na amostra. A actividade enzimática da BAP captada é detectada com um substrato de pNPP.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

96 ensaios para fosfatase alcalina específica do osso

O kit MicroVue BAP EIA contém o seguinte:

A BAP Standards A – F Peças 4395 a 4400 0,4 mL cada

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

C BAP purificada proveniente de células SAOS-2 de osteossarcoma numa solução tamponada contendo cloreto de magnésio, sulfato de zinco, surfactante, proteína transportadora, corante azul e azida de sódio (0,05%) como conservante

D

L Controlos inferiores/superiores

H Peças 4401, 4402 0,4 mL cada

BAP purificada proveniente de células SAOS-2 de osteossarcoma numa solução tamponada contendo cloreto de magnésio, sulfato de zinco, surfactante, proteína transportadora, corante azul e azida de sódio (0,05%) como conservante

1 Tiras revestidas Peça 4660 12 de cada
Anticorpo de IgG anti-BAP monoclonal murínico purificado absorvido em tiras de poços

2 Solução de paragem da reacção Peça 4702 15 mL
NaOH 0,5N

3 Tampão de lavagem 10X Peça 4703 55 mL
Detergente não-iónico numa solução tamponada contendo azida de sódio (0,05%) como conservante

4 Tampão de análise Peça 4403 27 mL
Uma solução tamponada contendo cloreto de magnésio, sulfato de zinco, surfactante e azida de sódio (0,05%) como conservante

5 Tampão de substrato Peça 4404 3 x 10 mL
Uma solução de 2-amino-2-metil-1-propanol contendo HEDTA, cloreto de magnésio, sulfato de zinco e azida de sódio (0,05%) como conservante

6 Comprimidos de substrato Peça 0012 3 x 20 mg
p-nitrofenil fosfato

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipetas para distribuição de 20 µL e 100 a 300 µL
- Itens adequados para medição de líquidos de 100 a 300 mL
- Recipiente para diluição do tampão de lavagem
- Água desionizada ou destilada
- Leitor de microplacas com capacidade de efectuar leituras da densidade óptica a $A_{405} > 2,0$
- Software adequado a regressão da curva de calibração quadrática

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. Para diagnóstico *in vitro*.
2. Tratar as amostras como material que possa constituir perigo biológico. Seguir as precauções universais ao manusear o conteúdo deste kit e quaisquer amostras dos doentes.
3. Eliminar os recipientes e o conteúdo não utilizado de acordo com os requisitos regulamentares federais, estaduais e locais.
4. Utilizar os reagentes fornecidos como uma unidade inteira antes da data de validade inscrita na etiqueta da embalagem.
5. Conservar os reagentes do ensaio conforme indicado.
6. Não utilizar as tiras revestidas se a bolsa estiver perfurada.
7. Analisar cada amostra em duplicado.
8. Utilizar vestuário de protecção, luvas e protecção ocular/facial adequados ao manusear o conteúdo deste kit.
9. NaOH 0,5N é considerado corrosivo e pode provocar irritação na pele. Não ingerir. Evitar o contacto com a pele, os olhos ou o vestuário. Se houver contacto, lavar com água. Em caso de ingestão, consultar um médico.
10. A azida de sódio é utilizada como conservante. O contacto ou ingestão acidental de tampões contendo azida de sódio pode provocar irritação na pele, nos olhos ou na boca. Utilizar os tampões apenas para os fins previstos e evitar o contacto com ácidos. A azida de sódio pode reagir com as canalizações de chumbo e de cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Aquando da sua eliminação, deixe correr muita água de modo a evitar uma acumulação deste produto.
11. O tampão de substrato contém 2-amino-2-metil-1-propanol e poderá provocar irritação nos olhos e/ou pele em caso de contacto prolongado. As zonas que tenham estado em contacto com este produto deverão ser imediatamente lavadas com água e sabão.
12. Diluir as amostras superiores a 140 U/L em tampão de análise e analisar novamente. Incluir o factor de diluição no cálculo final.

13. Para assegurar o fornecimento atempado dos reagentes, recomenda-se a utilização de pipetas multicanal ou de repetição.
14. Para uma medição precisa de amostras, adicionar as amostras e os padrões com precisão. Utilizar a pipeta com cuidado recorrendo apenas a equipamento calibrado.
15. Este ensaio pode ser efectuado com qualquer método de lavagem validado.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Colocar os reagentes e os materiais destinados ao ensaio à temperatura de 20–28°C antes de os utilizar. Depois de retirar os reagentes e materiais necessários, volte a colocar os materiais não usados à temperatura de 2–8°C.

Tiras revestidas

Remover a armação das tiras de poços e retirar o número necessário de tiras revestidas da bolsa (ver quadro na secção *PROCEDIMENTO DE ENSAIO*). Verificar se a bolsa que contém as tiras não usadas fica perfeitamente selada.

Tampão de lavagem

Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro) diluindo o tampão de lavagem 10X concentrado na proporção de 1:10 com água desionizada. Conservar a 20–28°C. Utilizar o tampão de lavagem 1X nas 21 dias seguintes à preparação.

Solução de substrato de trabalho

Preparar a solução de substrato de trabalho 1 hora antes da sua utilização. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário à 20–28°C (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente. Eliminar a solução de substrato de trabalho restante após a utilização.

ARMAZENAMENTO

Conservar o kit a 2–8°C. Não congelar. Conservar os reagentes não utilizados a 2–8°C. Equilibrar os reagentes até 20–28°C antes de utilizar. Conservar o tampão de lavagem 1X (10X diluído) a 20–28°C.

COLHEITA E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

Efectuar a colheita do soro utilizando uma técnica de venipunctura padrão. As amostras devem ser colhidas sem anticoagulantes e de forma a evitar a hemólise. Deixar o sangue coagular e separar o soro por centrifugação. O soro pode ser conservado durante 5 dias a 2–8°C, a ≤ -40°C durante 12 meses ou a ≤ -80°C durante 36 meses. Não sujeitar as amostras a mais de 3 ciclos de congelação e descongelação.

O soro “do coágulo”, o soro do tubo de separação do soro, o plasma de heparina Na e o plasma de heparina Li produzem resultados substancialmente equivalentes. Recomenda-se que as amostras de plasma não sejam preparadas utilizando agentes de quelação como o EDTA ou o citrato.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Ler o folheto informativo completo antes de iniciar o ensaio.

Ver *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES* antes de prosseguir.

Determine a quantidade de cada reagente necessário para o número de tiras que vão ser utilizadas.

N.º de tiras	4	6	8	12
N.º de amostras (analisadas em duplicado)	8	16	24	40
Substrato (frasco)	1	1	2*	2*
Tampão de lavagem 1X (mL)	100	150	200	300

* Quando se vai utilizar mais do que um frasco, combinar o conteúdo e misturar antes de utilizar.

Incubação da amostra

1. Remover a armação das tiras de poços e retirar o número necessário de tiras revestidas da bolsa (ver quadro) imediatamente antes de utilizar. Verificar se a bolsa de papel de alumínio que contém as tiras não usadas fica perfeitamente selada.
2. Colocar o número pretendido de tiras revestidas na armação das tiras de poços. Rotular as tiras para evitar que se misturem em caso de remoção accidental da armação das tiras de poços.
3. Adicionar 125 µL de tampão de análise a cada poço.
4. Adicionar 20 µL de padrão, controlo ou amostra a cada poço. **Não** misturar com tampão de análise por meio de pipetagem de repetição. Este passo deverá estar concluído em 30 minutos. **Agitar suavemente as tiras para assegurar a mistura da amostra e do tampão.**
5. Incubar durante 3 horas (± 10 minutos) a 20–28°C.
6. Preparar a solução de substrato de trabalho 1 hora antes da sua utilização. Colocar um comprimido de substrato em cada frasco de tampão de substrato necessário à 20–28°C (ver quadro). Deixar os comprimidos dissolver durante 30 a 60 minutos. Agitar vigorosamente os frascos para misturar completamente.

Passo de lavagem

7. Preparar a quantidade necessária de tampão de lavagem 1X (ver quadro) diluindo o tampão de lavagem 10X na proporção de 1:10 com água desionizada. Conservar a 20–28°C. Utilizar o tampão de lavagem 1X nas 21 dias seguintes à preparação.
8. Inverter/esvaziar manualmente as tiras. Adicionar pelo menos 250 µL de tampão de lavagem 1X a cada poço e inverter/esvaziar manualmente as tiras. Repetir mais três vezes para um total de quatro lavagens. Secar as tiras comprimindo-as bem sobre toalhas de papel após a última lavagem.

Incubação do substrato

9. Adicionar 150 µL de solução de substrato de trabalho a cada poço. Eliminar a solução de substrato de trabalho restante após a utilização.
10. Incubar durante 30 minutos (± 5 minutos) a 20–28°C.

Parar/Ler

- Adicionar 100 µL de solução de paragem a cada poço. Adicionar a solução de paragem seguindo o mesmo padrão e os mesmos intervalos de tempo utilizados na adição da solução de substrato.
- Ler a densidade óptica a 405 nm. Assegurar que não existem bolhas de grandes dimensões nos poços e que o fundo das tiras está limpo. As tiras devem ser lidas **15 minutos** depois da adição da solução de paragem da reacção.
- É necessário** utilizar software de quantificação com uma equação de regressão adequada a uma curva de calibração quadrática para analisar os resultados do ensaio MicroVue BAP.

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

CONTROLO DE QUALIDADE

O Certificado de Análise incluído neste kit é específico do lote e deve ser utilizado para verificar se os resultados obtidos pelo seu laboratório são semelhantes aos obtidos na Quidel Corporation. Os valores da densidade óptica são fornecidos e devem ser utilizados apenas como linha de orientação. Os resultados obtidos pelo seu laboratório podem ser diferentes.

São fornecidos intervalos para o controlo de qualidade. Os valores de controlo destinam-se a verificar a validade da curva e os resultados das amostras. Cada laboratório deve definir os seus próprios parâmetros para os limites aceitáveis dos ensaios. Se os valores de controlo **NÃO** estiverem dentro dos limites de aceitação do seu laboratório, os resultados dos ensaios devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

Se a densidade óptica do MicroVue BAP Standard F for inferior a 1,0, os resultados devem ser considerados questionáveis e as amostras devem ser repetidas.

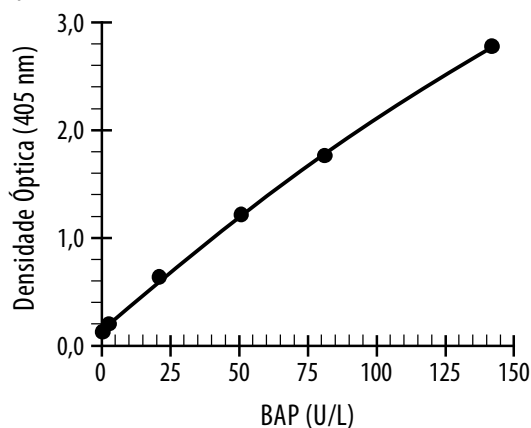
INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados das amostras são expressos como U/L e **não** necessitam de ser corrigidos para a diluição (a não ser que a amostra tenha sido diluída antes das análises).

No ensaio MicroVue BAP, 1 unidade representa 1 µmol de pNPP hidrolizado por minuto a 25°C em tampão de 2-amino-2-metil-1-propanol.

Curva padrão representativa

Níveis padrão da BAP: 0, 2, 20, 50, 80, 140 U/L



LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Interferência da HAMA

Algumas pessoas têm anticorpos à proteína do rato (HAMA), que podem causar interferência nos imunoenaios que empregam anticorpos derivados de ratos. Foi referido, em particular, que as amostras de soro de doentes que foram submetidos a terapêutica ou a procedimentos de diagnóstico que incluem a perfusão de anticorpo monoclonal de rato podem produzir resultados errôneos. Por este motivo, os resultados obtidos com o ensaio MicroVue BAP devem ser utilizados apenas em conjunto com os resultados de qualquer outro procedimento de diagnóstico e com as informações disponíveis provenientes da avaliação clínica do doente.

As amostras com aumentos significativos da actividade da fosfatase alcalina hepática podem causar resultados aberrantemente elevados no ensaio MicroVue BAP.

As pessoas com doença de Paget que têm baixos níveis da doença podem ter níveis de fosfatase alcalina específica do osso situados dentro do intervalo de referência do ensaio MicroVue BAP.

VALORES DA AMOSTRA

Os intervalos de referência da BAP foram estabelecidos para homens normais com mais de 25 anos de idade (n = 126), mulheres normais antes da menopausa com idades compreendidas entre os 25 e os 44 anos (n=178) e mulheres normais depois da menopausa (n = 107). Para efeitos do estabelecimento dos intervalos de referência, os participantes normais foram definidos como:

- Basicamente saudáveis, sem distúrbios ósseos, endócrinos ou crónicos
- Ciclos menstruais regulares (mulheres antes da menopausa)
- Nem grávidas nem em fase de aleitamento (mulheres)
- Sem estarem actualmente a tomar qualquer medicação conhecida por influenciar o metabolismo ósseo

Os valores podem ser influenciados por factores como a baixa produção de estrogénio, baixa ingestão de cálcio ou actividade física reduzida.⁸ A deficiência de estrogénio nas mulheres após a menopausa pode ter como resultado uma renovação óssea aumentada.^{3,4} Cada laboratório deve definir os seus próprios intervalos de referência normais. Os limites são expressos como intervalos de referência não paramétricos (IC de 90%).

	Idade (anos)		Intervalos (U/L)	Média
Mulheres	25 - 44	Antes da menopausa	11,6 – 29,6	18,3
Mulheres	≥ 45	Depois da menopausa	14,2 – 42,7	25,0
Homens	≥ 25		15,0 – 41,3	23,2

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Especificações do anticorpo

O anticorpo da fosfatase alcalina específica do osso tem uma elevada afinidade selectiva pela isoforma da fosfatase alcalina específica do osso, uma baixa reactividade cruzada com a forma de fosfatase alcalina do fígado e uma ligação negligenciável das isoenzimas intestinais e placentárias.

Isoenzima AP	% Reactividade
Osso	100
Fígado	3 – 8
Placenta	0
Intestino	0,4

Sensibilidade

O limite de detecção mínimo do ensaio MicroVue BAP é 0,7 U/L, determinado pelo limite superior de 3 DP num estudo de precisão de padrão zero.

Recuperação – Recuperação por fortificação

A recuperação por fortificação foi determinada adicionando uma quantidade conhecida de BAP purificada a amostras de soro com diferentes níveis de BAP endógena. Os resultados típicos são fornecidos após a fortificação das amostras de soro com concentrações baixas, médias e elevadas de BAP seguida de análise em triplicado.

Endógena (U/L)	Adicionada (U/L)	Observada (U/L)	Recuperação (%)
13,4	15,7	29,1	99
17,6	37,5	55,3	99
27,2	57,2	88,1	106

Recuperação – Linearidade

A linearidade foi determinada diluindo amostras em série e comparando os valores observados com os valores esperados. Os resultados típicos são apresentados a seguir.

Amostra	Factor de diluição	Observado (U/L)	Esperado (U/L)	Recuperação (%)
1	razão	108,5	-	-
	1:2	51,1	54,2	94
	1:4	25,8	27,1	99
	1:6	18,0	18,1	99
	2	razão	39,1	-
1:2		20,1	19,5	103
1:4		10,3	9,8	105
1:6		6,7	6,5	103
3		razão	58,4	-
	1:2	29,9	29,2	102
	1:4	15,7	14,6	108
	1:6	9,7	9,7	100

Precisão

A precisão intra ensaios foi determinada para ≥ 20 réplicas em 3 placas de cada 3 lotes de kits (9 placas no total). A precisão entre ensaios foi determinada para ensaio de 3 amostras de soro em 6 placas separadas de cada 3 lotes de kits (18 placas no total). Os resultados típicos são apresentados a seguir.

BAP (U/L BAP)	Intra ensaios ¹ CV%	Entre ensaios ² CV%
12	5,8	5,2
35	3,9	7,6
100	5,2	5,0

¹ n=21

² n=6 ensaios

Substâncias interferentes

As substâncias seguintes foram analisadas às concentrações especificadas, tendo sido concluído que não interferem com a análise.

Substância	Concentração
Hemoglobina	500 mg/dL
Bilirrubina	25 mg/dL
Triglicéridos	1420 mg/dL
Proteína total	6,0 g/dL †
Proteína total	15,6 g/dL †
Proteína total	6,0 g/dL ‡
Proteína total	15,6 g/dL ‡

† Proteína com água

‡ Proteína com BAP (concentração de BAP = 43,6 U/L)

Interferências de fármacos

Foram adicionadas diversas concentrações de fármacos a três "pools" de soro separados contendo aproximadamente 35, 70 e 105 U/L de BAP e analisadas em triplicado. Os fármacos e as concentrações mais elevadas analisadas foram os seguintes:

Substância	Concentração mais elevada
Etidronato	350 µg/mL
Estrogénio	100 µg/mL
Ibuprofeno	150 µg/mL
Acetaminofeno	350 µg/mL
Aspirina	350 µg/mL
Calcitonina - Humana	80 µg/mL
Calcitonina - Salmão	80 µg/mL
Cálcio	500 µg/mL
Mistura de noretindrona/etinilestradiol (contraceptivo oral)	3 mg/mL
Vitamina D	400 IU/mL

Exactidão

Foram realizados estudos comparativos para avaliar as correlações entre as medições da fosfatase alcalina específica do osso (BAP) no soro, obtidas utilizando o ensaio MicroVue BAP, e os resultados obtidos utilizando três métodos actualmente comercializados para medir a fosfatase alcalina total (TAP) ou a BAP. Os estudos foram realizados num centro de investigação clínica independente, utilizando soros de 114 doentes com doença de Paget e 464 participantes saudáveis. O primeiro método comparativo foi uma técnica colorimétrica para a medição da TAP. O coeficiente de correlação (r) obtido entre este método colorimétrico e o ensaio MicroVue BAP foi de 0,99. O segundo método comparativo foi um método de electroforese para a determinação dos níveis isoenzimáticos de BAP ($r = 0,99$). O terceiro método comparativo foi um ensaio imunoradiométrico para a medição da BAP ($r = 0,99$). Dos 114 doentes diagnosticados com doença de Paget, 101 doentes apresentavam valores superiores ao limite superior dos intervalos de referência do ensaio MicroVue BAP. Treze doentes apresentavam valores inferiores ao limite superior dos intervalos de referência.

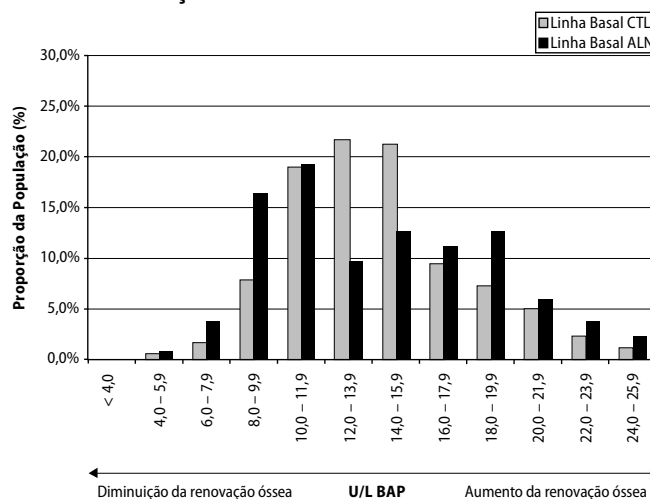
ESTUDOS CLÍNICOS

Utilização do ensaio MicroVue BAP para monitorização da eficácia da terapêutica anti-reabsorção na osteoporose

Foi realizado com sucesso um estudo randomizado multicêntrico para estabelecer a segurança e a eficácia do ensaio MicroVue BAP para monitorizar as alterações nas concentrações séricas de BAP associadas à terapêutica anti-reabsorção com amino-bifosfonato (alendronato). As participantes, retiradas de um estudo de maior dimensão sobre a eficácia do alendronato no tratamento da osteoporose,⁷ eram mulheres depois da menopausa, com idades compreendidas entre os 45 e os 84 anos (média 64 ± 7 anos), diagnosticadas com osteoporose (com base na apresentação clínica ou na densidade mineral óssea basal na coluna lombar [LSBMD] com mais de 2,5 desvios padrão abaixo da média para mulheres maduras antes da menopausa). Na linha basal, as participantes elegíveis foram randomizadas para receberem 10 mg de alendronato e 500 mg de cálcio por dia (ALN) ou placebo e 500 mg de cálcio por dia (CTL). Foram obtidas amostras de soro de todas as participantes na linha basal, aos 3, 6 e 12 meses.

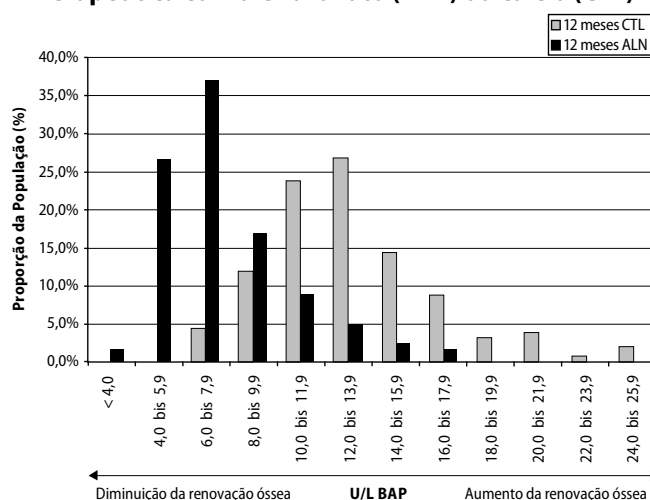
A concentração média (± 1 DP) de BAP na linha basal ($14,6 \pm 5,4$ vs. $14,6 \pm 4,6$, $p = 0,900$) e LSBMD ($0,74 \pm 0,10$ vs. $0,75 \pm 0,09$, $p = 0,751$) apresentaram valores semelhantes para o ALN e o CTL. As distribuições dos valores da BAP na linha basal no ALN e no CTL estão ilustradas na figura seguinte, por proporção da população do estudo.

Distribuição dos níveis de BAP na linha basal



A BAP foi significativamente menor para o ALN do que para o CTL ao fim de 3 ($9,6 \pm 3,5$ vs. $13,4 \pm 4,0$, $p < 0,00001$), 6 ($8,0 \pm 3,0$ vs. $13,2 \pm 3,8$, $p < 0,00001$) e 12 meses ($7,8 \pm 2,6$ vs. $13,3 \pm 3,9$, $p < 0,00001$). As distribuições dos valores da BAP ao fim de 12 meses nos grupos do ALN e do CTL estão ilustradas na figura seguinte.

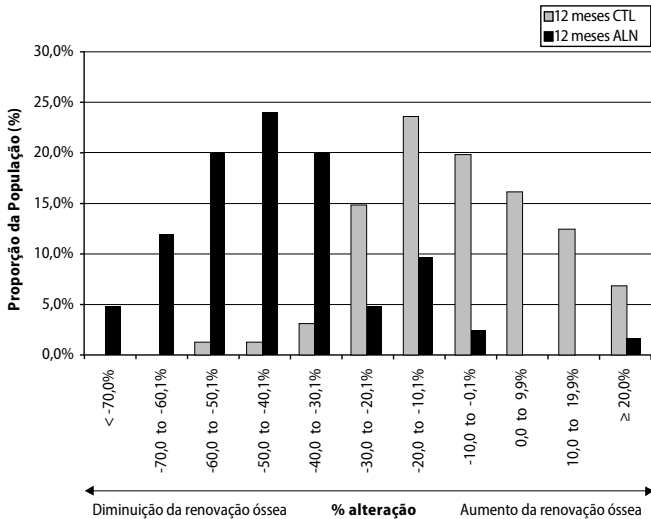
Distribuição dos níveis de BAP ao fim de 12 meses Terapêutica com alendronato (ALN) ou cálcio (CTL)



A concentração média (± 1 DP) de BAP nas participantes do CTL diminuiu modestamente da linha basal para $-5,4\%$ ($\pm 19,1\%$) aos 12 meses ($p = 0,00004$), o que pode reflectir o efeito limitado do cálcio na conservação do osso.¹³

As concentrações médias de BAP nas participantes do ALN diminuíram $30,5 \pm 24,6\%$ aos 3 meses, $42,8 \pm 17,3\%$ aos 6 meses e $42,2 \pm 19,2\%$ aos 12 meses. As participantes do ALN demonstraram maior probabilidade do que as participantes do CTL para sofrer perdas de BAP superiores à alteração percentual mínima¹⁴, com $68,5\%$, $83,9\%$ e $86,1\%$ das participantes do ALN e $9,5\%$, $15,9\%$ e $9,0\%$ das participantes do CTL a diminuir em $\geq 25\%$ ao fim dos períodos de 3, 6 e 12 meses. As distribuições da alteração percentual em relação à linha basal nos valores da BAP ao fim de 12 meses nos grupos do ALN ou do CTL estão ilustradas na figura seguinte.

Distribuição da alteração percentual dos níveis de BAP ao fim de 12 meses Terapêutica com alendronato (ALN) ou cálcio (CTL)



Ao fim de 12 meses, as participantes do ALN tinham ganho LSBMD em comparação com o CTL ($p < 0,00001$), conforme indicado no quadro seguinte.

Alterações na LSBMD (média \pm DP)

	n	Linha basal (g/cm ²)	12 meses (g/cm ²)	Δ (%)
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

Estes resultados indicam que o ensaio MicroVue BAP é seguro e eficaz na monitorização do efeito anti-reabsorção da terapêutica com amino-bifosfonato (alendronato) entre as participantes diagnosticadas com osteoporose.

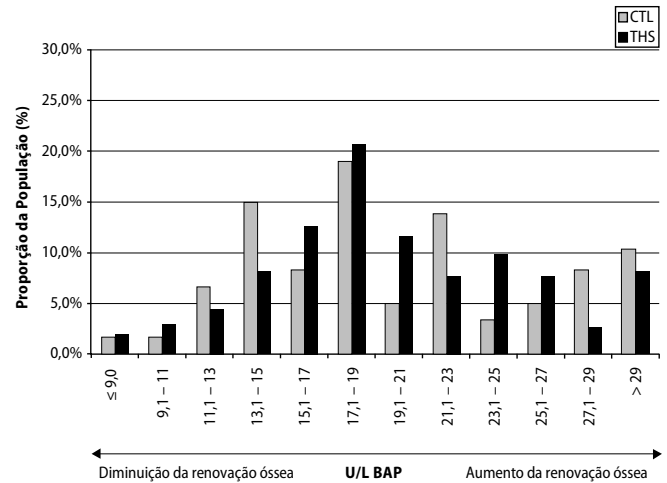
Utilização do ensaio MicroVue BAP na monitorização da terapêutica hormonal anti-reabsorção e na previsão da resposta óssea (densidade mineral óssea) em mulheres depois da menopausa

Terapêutica de monitorização:

Foi realizado com sucesso um estudo randomizado multicêntrico para estabelecer a segurança e a eficácia do ensaio MicroVue BAP para monitorizar as alterações nas concentrações séricas de BAP associadas à terapêutica anti-reabsorção com estrogénio/progestina. O aumento da renovação óssea e a perda significativa de osso estão frequentemente associados à deficiência de estrogénio depois da menopausa. Foi demonstrado que a substituição do estrogénio reduz eficazmente a renovação óssea e protege a massa óssea existente.^{3,6} As participantes eram mulheres depois da menopausa, com idades compreendidas entre os 45 e os 64 anos (média 56 \pm 4 anos), que tinham atingido a menopausa natural ou cirúrgica nos últimos 10 anos. Na linha basal, as participantes elegíveis foram randomizadas para um grupo de tratamento activo (terapêutica hormonal de substituição ou THS): Premarin® (0,625 mg por dia) com progestina placebo, Premarin (0,625 mg por dia) e uma progestina activa (Provera® 2,5 mg/dia contínua, Provera 10 mg/dia cíclica ou progesterona micronizada 200 mg/dia cíclica); ou para o grupo de controlo (CTL): estrogénio placebo e progestina placebo. Foram obtidas amostras de soro de todas as participantes na linha basal e aos 12 meses.

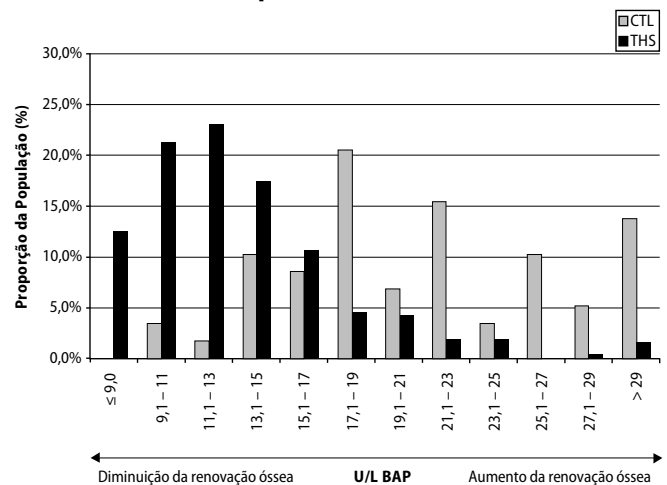
A concentração média (\pm 1 DP) de BAP na linha basal (20,7 \pm 7,6 vs. 20,3 \pm 6,8 U/L, $p = 0,704$) e a LSBMD (0,97 \pm 0,17 vs. 0,97 \pm 0,15 g/cm², $p = 0,970$) foram semelhantes para o CTL e a THS. As distribuições dos valores da BAP na linha basal na THS e no CTL estão ilustradas na figura seguinte, por proporção da população do estudo.

Distribuição dos níveis de BAP na linha basal



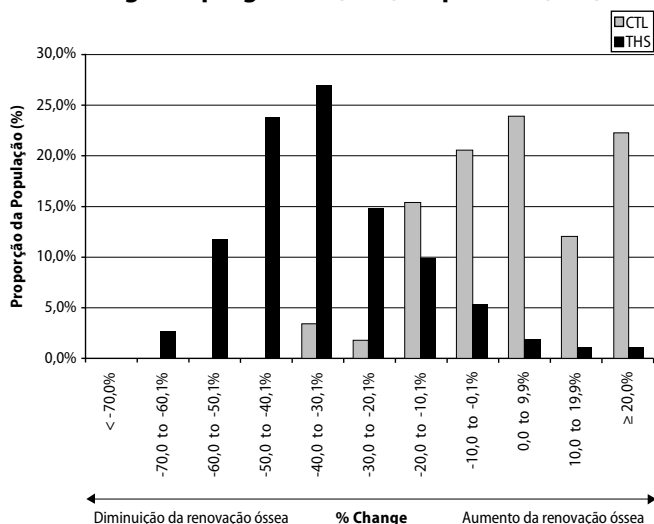
A BAP foi significativamente menor na THS do que no CTL ao fim de 12 meses (13,3 \pm 5,0 vs. 21,9 \pm 7,9 U/L, $p < 0,00001$). As distribuições dos valores da BAP ao fim de 12 meses nos grupos de THS e de CTL estão ilustradas na figura seguinte.

Distribuição dos níveis de BAP ao fim de 12 meses Terapêutica com estrogénio/progestina (THS) ou placebo (CTL)



A concentração média (\pm 1 DP) de BAP nas participantes do CTL aumentou ligeiramente da linha basal para +9,8% (\pm 33,2%) aos 12 meses ($p=0,08$), enquanto as concentrações de BAP nas participantes da THS diminuíram da linha basal para -32,4 (\pm 21,5%) aos 12 meses ($p < 0,00001$). As participantes da THS demonstraram maior probabilidade do que as participantes do CTL para sofrer perdas de BAP superiores à alteração percentual mínima¹², com 73,3% das participantes da THS e 3,4% das participantes do CTL a diminuir em $\geq 25\%$ ao fim do período de 12 meses. As distribuições da alteração percentual em relação à linha basal nos valores da BAP ao fim de 12 meses nos grupos de THS e de CTL estão ilustradas na figura seguinte.

Distribuição da alteração percentual dos níveis de BAP ao fim de 12 meses Terapêutica com estrogénio/progestina (THS) ou placebo (CTL)



Ao fim de 12 meses, as participantes da THS tinham ganho LSBMD em comparação com o CTL ($p < 0,00001$), conforme indicado no quadro seguinte.

Alterações na LSBMD (média ± DP)

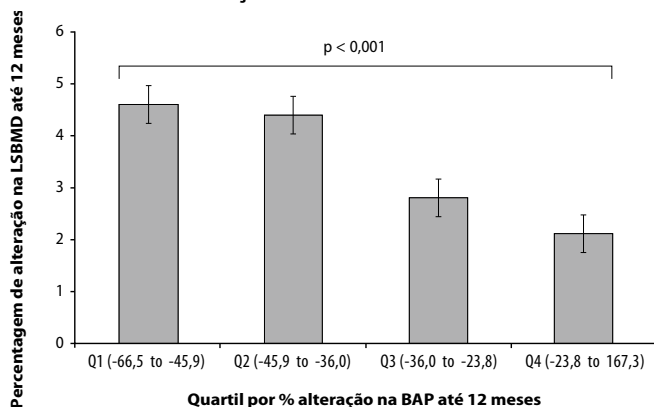
	n	Linha basal (g/cm ²)	12 meses (g/cm ²)	Δ (%)
CTL	58	0,97 ± 0,17	0,95 ± 0,16	-1,6 ± 2,8
HRT	262	0,97 ± 0,15	1,00 ± 0,15	+3,5 ± 2,8

Estes resultados indicam que o ensaio MicroVue BAP é seguro e eficaz na monitorização do efeito anti-reabsorção da terapêutica hormonal de substituição (THS) nas mulheres depois da menopausa.

Previsão da resposta óssea:

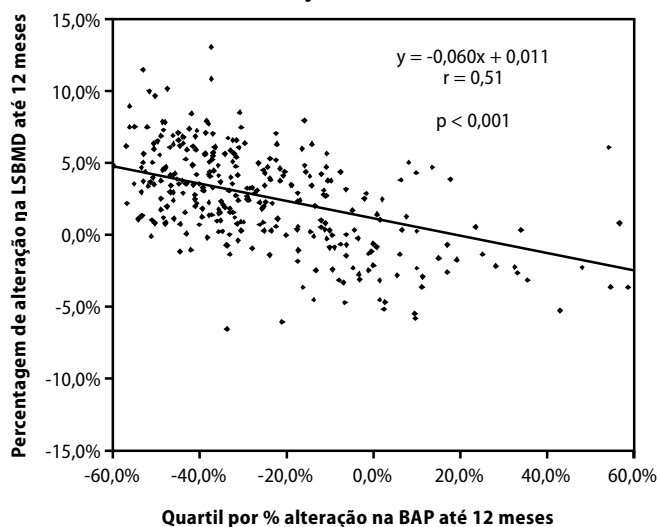
A figura seguinte ilustra a % de diminuição dos valores da BAP em relação à linha basal até 12 meses por quartil para o grupo tratado com THS. As participantes no quartil mais elevado (Q1: maior % de diminuição) revelaram o maior ganho em LSBMD em resposta à THS.

Grupo da THS – Valores da % de alteração na BAP até 12 meses estratificados por quartil e correspondente % de alteração na LSBMD aos 12 meses



A figura seguinte apresenta a análise de regressão linear ($y = -0,060x + 0,011$, $r = -0,51$, $p < 0,001$) da alteração percentual em relação à linha basal até 12 meses da BAP e da alteração percentual em relação à linha basal até 12 meses da densidade mineral óssea (BMD) para todas as participantes do estudo (placebo e tratadas).

Estudo da THS – Regressão linear da % de alteração na LSBMD e na BAP em relação à linha basal até 12 meses



A análise do quadro de contingência revelou que uma diminuição $\geq 25\%$ na BAP aos 12 meses estava significativamente associada ($p < 0,0001$) a uma resposta óssea positiva à THS (ganho em BMD) aos 12 meses. Os intervalos de confiança de 85% binómicos (aproximação de segunda ordem) para a sensibilidade e a especificidade de utilizar uma diminuição de 25% na BAP para prever a resposta à THS são:

Sensibilidade = 77% (IC de 95%, 75%, 82%);
Especificidade = 61% (IC de 95%, 41%, 78%).

Estes resultados indicam que a % de alteração na concentração de BAP pode ser utilizada para prever o grau de resposta óssea (BMD) ao tratamento com THS.

ASSISTÊNCIA

Para serviço fora dos EUA, contacte o seu distribuidor local. A informações adicionais sobre Quidel, nossos produtos, e nossos distribuidores pode ser encontrada em nosso web site em www.quidel.com.

REFERÊNCIAS

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.

GLOSSÁRIO



Consulte as instruções de utilização no CDROM



Finalidade

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



Quidel Corporation | 10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121 USA | www.quidel.com



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany