

Instructions for Use

BAP (Ostase) ELISA

IVD



REF EIA-4425

Σ 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE.....	2
2	SUMMARY AND EXPLANATION	2
3	PRINCIPLES OF THE PROCEDURE	3
4	PRODUCT INFORMATION	3
5	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
6	STORAGE AND STABILITY	4
7	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	4
8	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....	5
9	PREPARATION OF REAGENTS	5
10	PROCEDURE	5
11	PROCEDURAL COMMENTS.....	6
12	INSTRUMENTATION AND CALCULATION OF RESULTS.....	6
13	QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS.....	8
14	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	8
15	EXPECTED VALUES.....	8
16	CLINICAL STUDIES.....	10
17	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	15
1	INDICACIONES	17
2	RESUMEN Y EXPLICACIÓN.....	17
3	PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO	19
4	INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO	19
5	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	20
6	ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD	20
7	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	20
8	MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS	20
9	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	21
10	PROCEDIMIENTO	21
11	COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO.....	22
12	INSTRUMENTACIÓN Y CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	22
13	CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS	23
14	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	23
15	VALORES ESPERADOS	23
16	ESTUDIOS CLÍNICOS	25
17	CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO ESPECÍFICAS.....	25
18	REFERENCES/BIBLIOGRAPHIE/LITERATUR	40
	SYMBOLS USED.....	42

1 INTENDED USE

The BAP (Ostase) ELISA Immunoenzymetric Assay is an in vitro device indicated for the quantitative measurement of bone-specific alkaline phosphatase (BAP), an indicator of osteoblastic activity, in human serum.

This device is intended to be used as an aid in the management of postmenopausal osteoporosis and Paget's disease.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

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

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

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

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

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

1.5 million fractures annually, including approximately 500,000 vertebral crush fractures, 250,000 hip fractures, and 200,000 distal radius fractures (2,5,17).

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

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

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

3 PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

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

The absorbance is proportional to the concentration of BAP present in the test sample. The calculation of BAP concentration in the sample is based on concurrent testing of BAP calibrators and Zero Calibrator/Diluent.

4 PRODUCT INFORMATION

Components for 96 Tests

Conjugate **CONJ** 1 x 14 mL

Anti-BAP (mouse monoclonal IgG) with biotin in a bovine/horse protein matrix with 0.09% sodium azide.

Microplate **MICROPLAT** 1 x 96 wells

Streptavidin coated plastic well strips in a plastic tray. Desiccant: silica gel.

Zero Calibrator/Diluent (0) **CAL 0** 1 x 14 mL

A bovine protein matrix containing no detectable concentration of BAP (0 µg BAP/L) and 0.09% sodium azide.

Calibrators (1-5) **CAL 1** - **5** 5 x 1 mL

A bovine protein matrix containing approximately 7, 15, 30, 60, and 90 µg human BAP/L and 0.09% sodium azide.

Low Control (1) **CTRL 1** 1 x 1 mL

A bovine protein matrix containing approximately 11 µg human BAP/L and 0.09% sodium azide.
Refer to Quality Control Report for assigned range.

High Control (2) **CTRL 2** 1 x 1 mL

A bovine protein matrix containing approximately 45 µg human BAP/L and 0.09% sodium azide.
Refer to Quality Control Report for assigned range.

Wash Concentrate **WASHBUF 20X** 1 x 50 mL

Phosphate buffered saline containing Tween.

Substrate **SUBS pNPP** 1 x 20 mL

p-nitrophenyl phosphate in a stabilizing buffer containing preservatives

Quench Reagent **NaOH** 1 x 14 mL

1 N sodium hydroxide.

Quality Control Report, Package Insert 1 each

5 WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

6 STORAGE AND STABILITY

- BAP (Ostase) ELISA assay reagents are to be stored between 2 °C and 8 °C, at which temperatures they are stable until the expiration date printed on the box label.
- Wash and Quench reagents are stable at 2 °C - 30 °C until the expiration dates printed on the bottle labels.
- All reagents must be brought to room temperature (18 °C - 25 °C) prior to use. After use all reagents except the Wash solution should be stored at 2 °C - 8 °C.
- Recovery of the kit control concentrations should fall within the stated ranges.
- Unused well strips should be returned to the plastic storage tray with the desiccant pouch provided and kept at 2 °C - 8 °C.
- Do not use kit components beyond the expiration date.
- The specimens storage and stability information stated above are general recommendations for use in a variety of settings of laboratories. Each laboratory should follow the guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations to establish its own specimens handling and storage stability. For guidance on appropriate practices, please refer to the CLSI GP44-A4, Procedures for Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline – Fourth Edition.

7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- No special preparation of the patient is necessary.
- A whole blood specimen should be obtained by acceptable medical technique.
- Allow the blood to clot and separate the serum by centrifugation.
- Specimens should be collected in such a way as to avoid hemolysis.
- Serum is required for the BAP (Ostase) ELISA assay.
Performance with plasma samples has not been established.
- If the serum sample is to be assayed in 24 - 48 hours after collection, the specimen should be stored in a refrigerator at 2 °C - 8 °C.
- Specimens held for longer times (up to 39 months) should be frozen at -80 °C.
- Turbid serum samples or samples containing particulate matter should be centrifuged prior to assay.

8 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

9 PREPARATION OF REAGENTS

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

10 PROCEDURE

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

The assay procedure is as follows:

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

11 PROCEDURAL COMMENTS

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

12 INSTRUMENTATION AND CALCULATION OF RESULTS

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

12.1 Computer-Assisted Method

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

12.2 Manual Method

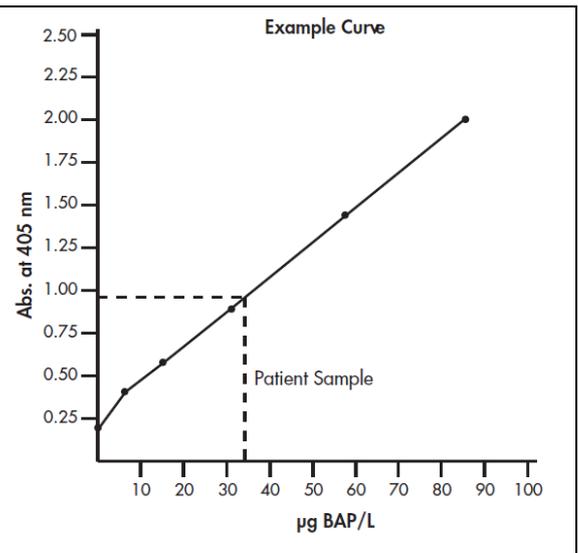
The BAP (Ostase) ELISA calibration curve may be constructed manually on linear graph paper by plotting the average absorbance for each calibrator on the y-axis versus the concentration of BAP in the Calibrator on the x-axis. A point-to-point curve should be drawn through the calibration points. Do not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

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

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

Example Data

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



13 QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS

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

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

14 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

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

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

15 EXPECTED VALUES

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

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

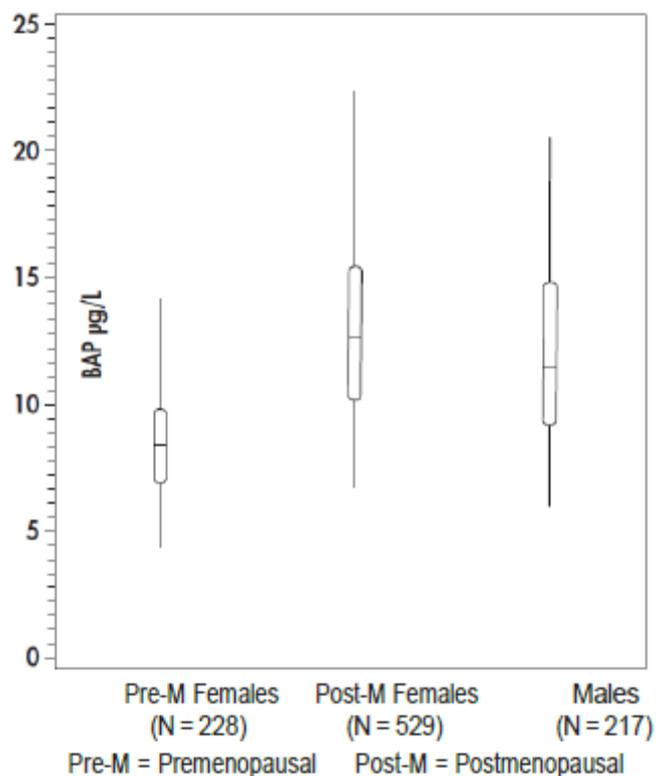
Summary of BAP Concentrations in Apparently Healthy Adults*

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

* Results generated with the Tandem-R Ostase Immunoradiometric Assay

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

Distribution of BAP Concentrations in Apparently Healthy Adults*



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

For each of the populations shown in the plot:

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

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

16 CLINICAL STUDIES

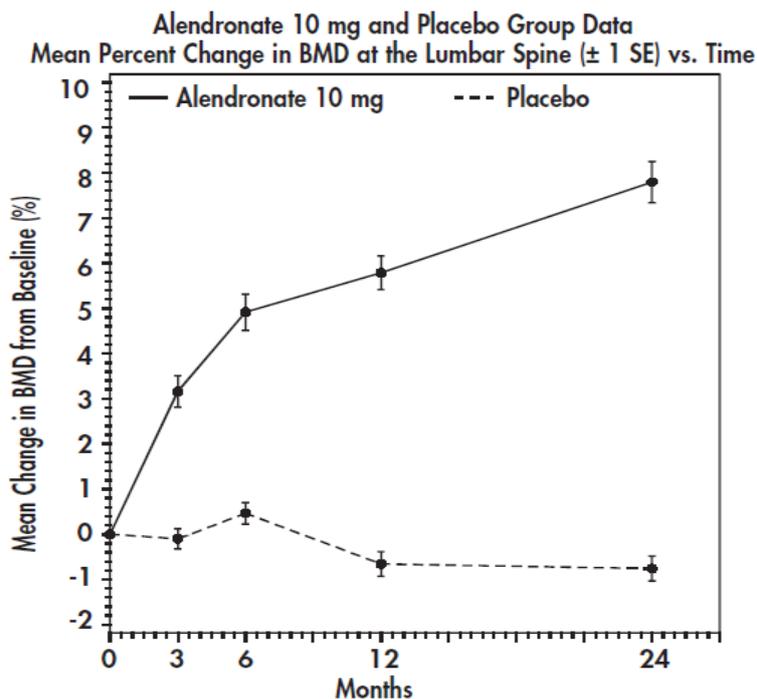
Paget's Disease

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

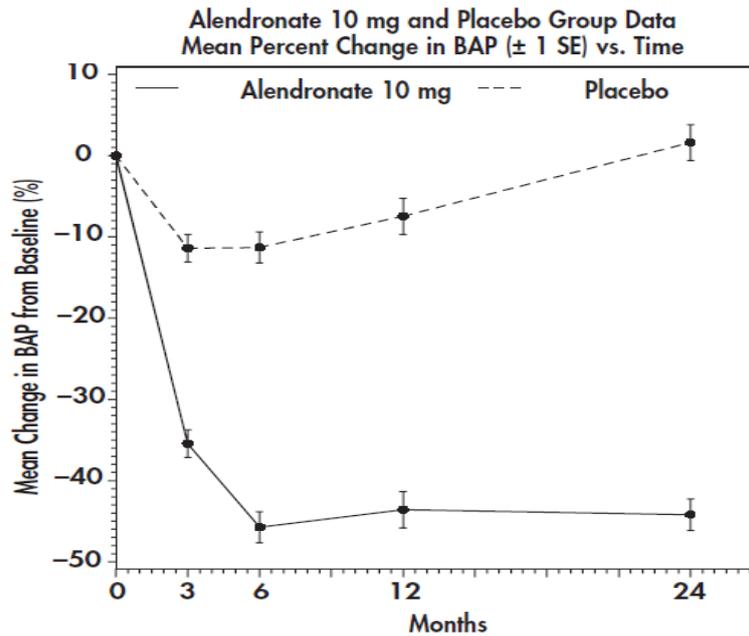
Postmenopausal Osteoporosis – Bisphosphonate Treatment

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

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



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



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

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

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

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

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

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

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

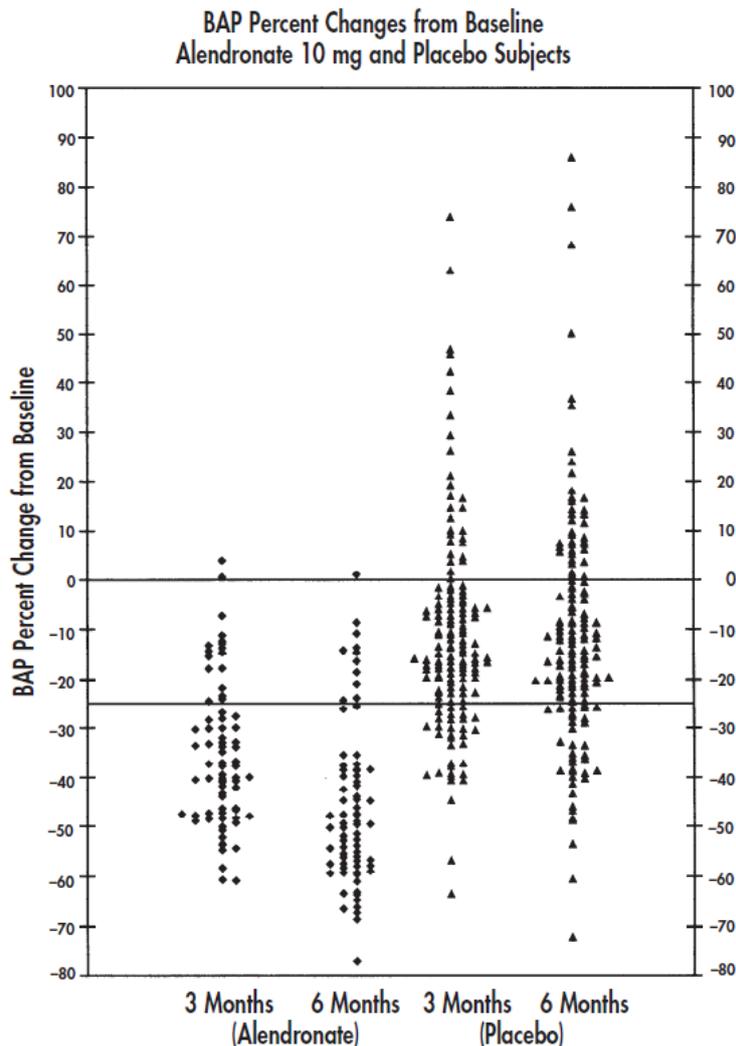
The minimum percent change for BAP as measured by the Tandem Ostase assay was calculated as 25%. Therefore, changes in BAP concentrations in postmenopausal women that exceed 25% may be attributed to changes in bone remodeling.

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

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

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

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



In summary, it has been demonstrated that:

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

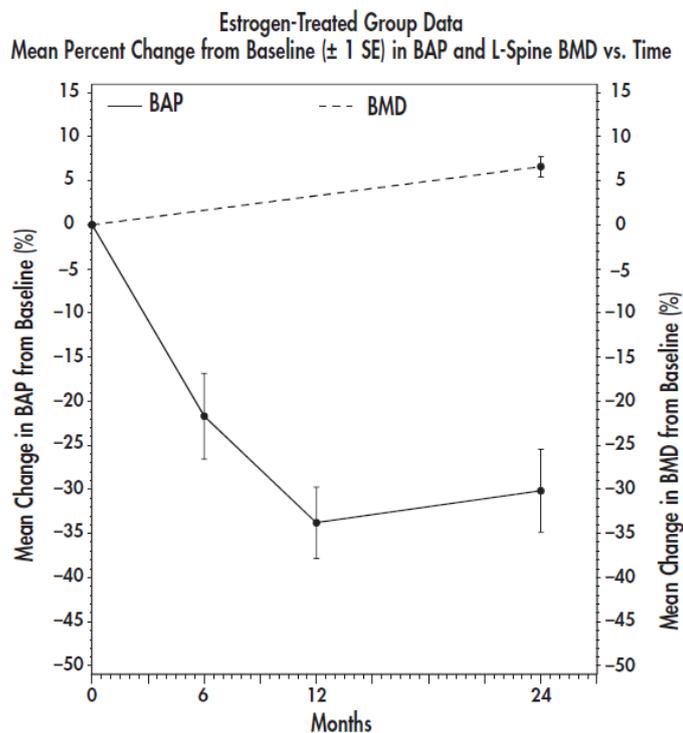
Subjects undergoing anti-osteoporotic therapy with alendronate whose BAP levels do not decrease by 25% from baseline at early time-points should be re-tested at later time-points. Of the 11 subjects who demonstrated less than 25% decrease in BAP from baseline at 6 months, 9 of them eventually demonstrated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

Postmenopausal Women – Hormone Replacement Therapy (HRT)

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

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

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



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

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

17 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

17.1 Within-Run Precision

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

Serum Pool	1	2	3	4
Number of Replicates	20	20	20	20
Mean µg/L	7.4	27.3	52.7	79.5
Standard Deviation	0.48	0.78	1.35	3.54
% CV	6.5	2.9	2.6	4.5

17.2 Between-Run Precision

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

Serum Pool	1	2	3	4
Number of Replicates	20	20	20	20
Mean µg/L	8.4	29.2	55.6	81.1
Standard Deviation	0.47	1.88	2.03	4.9
% CV	5.8	6.44	3.7	2

17.3 Recovery and Dilution

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

Spike µg/L	Expected Concentration µg/L	Observed Concentration µg/L	% Recovery*
14.0	24.6	24.8	100.9
39.9	50.5	48.8	96.6
59.2	69.8	66.0	94.6
92.2	102.8	92.6	90.1

*% recovery equals the observed concentration divided by the expected concentration

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

Dilution	Expected Concentration µg/L	Observed Concentration µg/L	% Recovery*
Neat	N/A	54.6	N/A
1:4	27.3	27.9	102.3
1:6	18.2	17.4	95.4
1:8	13.7	12.7	92.8

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

17.4 Interfering Substances

- Hemoglobin, which was tested at concentrations up to 500 mg/dL, does not interfere with the BAP (Ostase) ELISA assay.
- Unconjugated and conjugated bilirubin, which were tested at concentrations up to 40 mg/dL and 20 mg/dL, respectively, do not interfere with the BAP (Ostase) ELISA assay.
- Triglycerides, which were tested at concentrations up to 2000 mg/dL, do not interfere with the BAP (Ostase) ELISA assay.
- Total protein, which was tested at concentrations between 3 and 14 g/dL, does not interfere with the BAP (Ostase) ELISA assay.
- 100 U/L Intestinal ALP produced a result of 1.0 µg/L in the BAP (Ostase) ELISA assay.

- 100 U/L Placental ALP did not produce a detectable result in the BAP (Ostase) ELISA assay.

17.5 Liver ALP Reactivity

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

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

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

- 100 U/L of liver ALP activity produced a result of 6.2 µg/L in the BAP (Ostase) ELISA assay; and
- 100 U/L of BAP activity produced a result of 36.9 µg/L in the BAP (Ostase) ELISA assay

17.6 Interference by Drugs

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

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

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

17.7 Minimum Detectable Concentration

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

1 INDICACIONES

El ensayo inmunoenzimático BAP (Ostase) ELISA es un mecanismo in vitro para la determinación cuantitativa de la fosfatasa alcalina específica de los huesos (BAP), un indicador de actividad osteoblástica, en el suero humano.

El uso previsto de este mecanismo es como ayuda en el manejo de la osteoporosis posmenopáusica y de la enfermedad de Paget.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

3 PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

BAP (Ostase) ELISA es un ensayo inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales en una fase sólida. Se hacen reaccionar muestras que contienen BAP con una disolución que contiene un anticuerpo monoclonal específico para BAP y marcado con biotina. La reacción tiene lugar en tiras de pocillos de plástico (fase sólida) recubiertas con estreptavidina y contenidas en un marco de plástico. Tras la formación de un complejo de la fase sólida/anticuerpo de captura/BAP, se lava la microplaca para eliminar la BAP no fijada y seguidamente se incuba con un sustrato enzimático. La cantidad de recambio del sustrato se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia de la reacción interrumpida en 405 nm en un lector de microplacas. La absorbancia es proporcional a la concentración de BAP presente en la muestra problema. El cálculo de la concentración de BAP se basa en la realización de pruebas concurrentes de calibradores de BAP y del Calibrador Cero/diluyente.

4 INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO

Conjugado **CONJ** 1 x 14 mL

Anti-BAP (IgG monoclonal murina) con biotina, matriz de proteínas bovinas-equinas con 0,09% de azida sódica.

Microplacas **MICROPLAT** 1 x 96 pocillos

Tiras de pocillos de plástico recubiertos de estreptavidina en una bandeja de plástico. Desecante: gel de sílice.

Calibrador Cero/diluyente (0) **CAL 0** 1 x 14 mL

Matriz de proteínas bovinas sin concentración detectable de BAP (0 µg BAP/L) y 0,09% de azida sódica

Calibradores (1-5) **CAL 1** - **5** 5 x 1 mL

Matriz de proteínas bovinas conteniendo aproximadamente 7, 15, 30, 60 y 90 µg de BAP humana/L y 0,09% de azida sódica. Para los valores asignados, consultar la tarjeta de calibración.

Control bajo (1) **CTRL 1** 1 x 1 mL

Matriz de proteínas bovinas conteniendo aproximadamente 11 µg de BAP humana/L y 0,09% de azida sódica. Para los rangos asignados, consultar la informe de control de calidad.

Control alto (2) **CTRL 2** 1 x 1 mL

Matriz de proteínas bovinas conteniendo aproximadamente 45 µg de BAP humana/L y 0,09% de azida sódica. Para los rangos asignados, consultar la informe de control de calidad.

Concentrado de lavado **WASHBUF 20X** 1 x 50 mL

Solución salina tamponada con fosfato y que contiene Tween.

Sustrato **SUBS pNPP** 1 x 20 mL

Reactivo de interrupción **NaOH** 1 x 14 mL

Hidróxido de sodio 1 N.

Informe de control de calidad, Prospecto 1 de cada

5 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

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

6 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Los reactivos del ensayo BAP (Ostase) ELISA deben almacenarse entre 2 °C y 8 °C, a cuya temperatura son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del envase.
- La solución de Lavado y el Reactivo de interrupción son estables entre 2 °C y 30 °C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de los frascos.
- Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) antes de su uso. Una vez utilizados, todos los reactivos a excepción de la solución de Lavado deben almacenarse entre 2 °C y 8 °C.
- La recuperación de las concentraciones del kit de control debe estar dentro de los límites indicados.
- Las tiras de pocillos no utilizados deberán volver a ponerse en las bandejas de almacenamiento de plástico con la bolsa de desecante que se incluye y almacenarse entre 2 °C y 8 °C.
- No utilizar los componentes del kit pasada la fecha de caducidad.
- La información de estabilidad y almacenamiento de muestras indicada anteriormente proporciona recomendaciones generales de uso en varios contextos de laboratorios. Cada laboratorio debe seguir las directrices o requisitos de las normas locales, nacionales y/o federales o de organizaciones autorizadas para establecer la estabilidad de almacenamiento y manipulación de sus propias muestras. Para obtener directrices sobre las prácticas adecuadas, consulte el documento CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

7 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- No se requiere preparación especial del paciente.
- Debe obtenerse una muestra de sangre total utilizando una técnica médica aceptable.
- Esperar a que la sangre se coagule y separar el suero por centrifugación.
- Las muestras deben obtenerse de manera que se evite la hemólisis.
- La muestra que se requiere para el ensayo BAP (Ostase) ELISA es el suero. No se ha establecido el rendimiento del ensayo con muestras plasmáticas.
- Si la muestra de suero debe analizarse en las 24 - 48 horas siguientes a su obtención, la muestra debe conservarse en un refrigerador entre 2 °C y 8 °C.
- Congelar las muestras que deben conservarse durante tiempos más prolongados (hasta 39 meses) a -80 °C.
- Las muestras de suero turbias o que contengan partículas deben centrifugarse antes de ser analizadas.

8 MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Pipeteadores de precisión de puntas desechables: volumen fijo o ajustable para 50, 100 y 150 µL (± 1%). Opcionalmente, se puede utilizar una pipeta de precisión multicanal junto con cubetas en forma de V desechables para la adición de los reactivos de conjugado, sustrato e interrupción del ensayo anti-BAP
- Puntas de pipeta desechables para 50, 100 y 150 µL

- Tubos de ensayo para diluciones de muestras
- Lavador de microplacas
- Dispositivo de aspiración
- Agua destilada
- Temporizador
- Recipiente para almacenar la solución de Lavado
- Lector de microplacas (longitud de onda primaria 405 nm, sustracción de fondo 600 - 650 nm) y programa informático de reducción de datos.
- Dispositivo de rotación horizontal de microplacas (intervalo de 500 a 900 rpm)

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

9 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

10 PROCEDIMIENTO

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

A continuación se indica el procedimiento del ensayo:

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

11 COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

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

12 INSTRUMENTACIÓN Y CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

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

12.1 Método asistido por ordenador

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

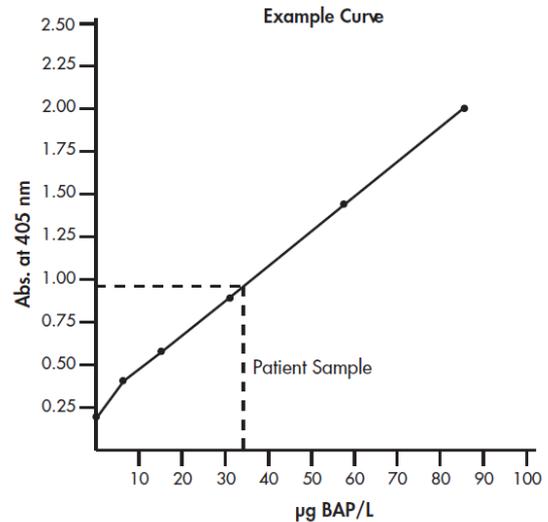
12.2 Método manual

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

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

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

Pocillo #	Descripción	Abs. 405 nm	Abs. media	BAP µg/L
1	Calibrador (0)	0.193		
2		0.187	0.190	0.0
3	Calibrador (1)	0.401		
4		0.402	0.402	7.2
5	Calibrador (2)	0.595		
6		0.572	0.584	15.5
7	Calibrador (3)	0.908		
8		0.866	0.887	31.9
9	Calibrador (4)	1.499		
10		1.460	1.479	58.4
11	Calibrador (5)	2.000		
12		2.051	2.026	85.8
13	Muestra de paciente	0.911		33.0



13 CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

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

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

14 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

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

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

15 VALORES ESPERADOS

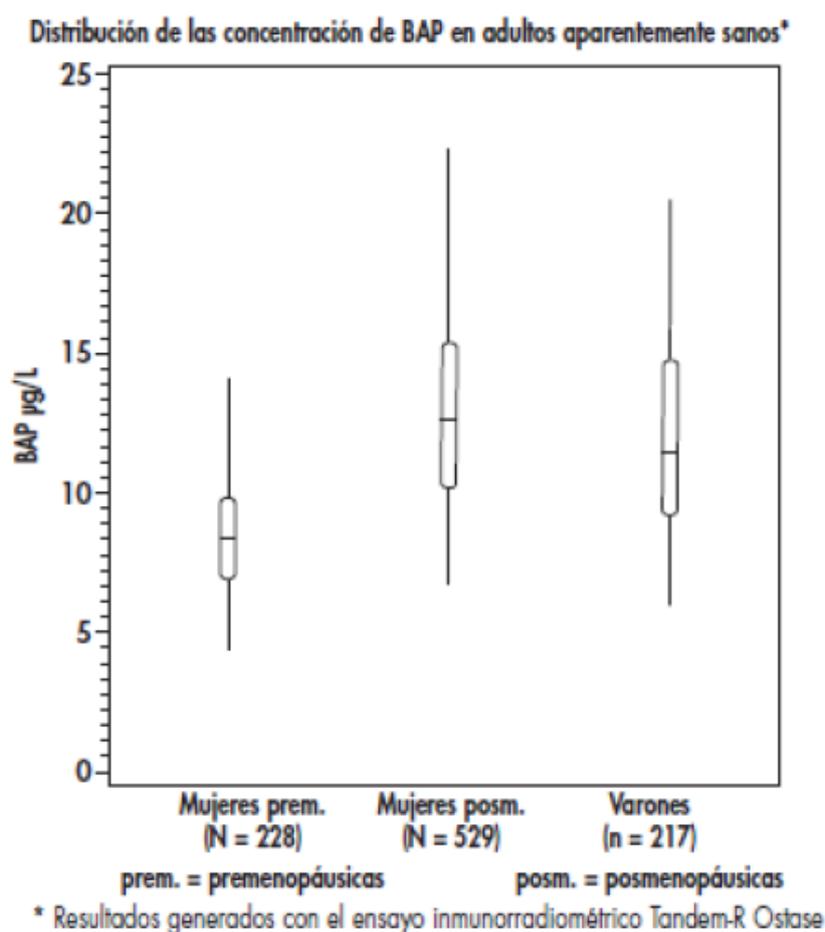
Los resultados de BAP que se presentan en las secciones de Valores esperados y Estudios clínicos se generaron con el ensayo Tandem-R Ostase. Sin embargo, un estudio de correlación entre los ensayos Ostase BAP y Tandem-R Ostase demostró una buena concordancia entre los ensayos ($y = 1,02x + 0,28$, $r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

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

Resumen de las concentraciones de BAP en adultos aparentemente sanos*

	N	BAP Media µg/L	DE	BAP Mediana µg/L	BAP Percentil 95 µg/L
Varones	217	12.3	4.3	11.6	20.1
Mujeres Pre-menopáusicas	228	8.7	2.9	8.5	14.3
Mujeres Pos-menopáusicas	529	13.2	4.7	12.5	22.4

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



En cada una de las poblaciones que se muestran en el gráfico:

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

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

Para información sobre

16 ESTUDIOS CLÍNICOS

17 CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO ESPECÍFICAS

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

1 UTILISATION

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

2 GENERALITES

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

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

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

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

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

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

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

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

3 PRINCIPES DU TEST

Le test Ostase® BAP EIA est un test immunoenzymétrique à deux sites sur phase solide utilisant des anticorps monoclonaux. Les échantillons contenant de la BAP sont mis en contact avec une solution contenant un anticorps monoclonal spécifique de la BAP et marqué à la biotine streptavidine et entourées d'un cadre en plastique. Après la formation d'un complexe phase solide/anticorps de capture/BAP, la microplaque est lavée pour éliminer la BAP non liée et elle est ensuite incubée avec un substrat enzymatique. La quantité de substrat consommé est déterminée par colorimétrie en mesurant l'absorption de la réaction après blocage à 405 nm dans un lecteur de microplaques. L'absorption est proportionnelle à la concentration de BAP présente dans l'échantillon à tester. Le calcul de la concentration en BAP présente dans l'échantillon est basé sur le dosage simultané des étalons BAP et de l'Etalon zéro/Diluant.

4 DESCRIPTION DU PRODUIT

Composants pour 96 tests

Conjugué **CONJ** 1 x 14 mL

Anti-BAP (IgG monoclonal de souris) à la biotine dans une matrice protéique bovine-cheval contenant 0,09% azoture de sodium.

Microplaques **MICROPLAT** 1 x 96 puits

En plastique constituées de barrettes de micropuits revêtus de streptavidine. Agent dessiccateur: gel de silice.

Etalon zéro/Diluant (0) **CAL 0** 1 x 14 mL

Matrice protéique bovine sans BAP détectable (0 µg de BAP/L) et contenant 0,09 % d'azoture de sodium.

Etalons (1-5) **CAL 1** - **5** 5 x 1 mL

Matrice protéique bovine contenant approximativement 7, 15, 30, 60 et 90 µg BAP humaine/L et 0,09 % d'azoture de sodium. Se référer à la carte d'étalonnage pour les concentrations attribuées.

Contrôle bas (1) **CTRL 1** 1 x 1 mL

Matrice protéique bovine contenant environ 45 µg BAP humaine/L et 0,09 % d'azoture de sodium. Consulter la rapport du contrôle de qualité pour la concentration attribuée.

Contrôle haut (2) **CTRL 2** 1 x 1 mL

Matrice protéique bovine contenant environ 45 µg BAP humaine/L et 0,09 % d'azoture de sodium. Consulter la rapport du contrôle de qualité pour la concentration attribuée.

Solution de lavage concentrée **WASHBUF 20X** 1 x 50 mL

Solution salée tamponnée au phosphate contenant du Tween.

Substrat **SUBS pNPP** 1 x 20 mL

p-Nitrophényl-phosphate stabilisé dans un tampon contenant des conservateurs.

Réactif de blocage **NaOH** 1 x 14 mL

Hydroxyde de sodium 1N.

Rapport du contrôle de qualité, Notice 1 de chaque

5 PRECAUTIONS D'UTILISATION

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

6 CONSERVATION ET STABILITE

- Les réactifs Ostase® BAP doivent être conservés entre 2 et 8 °C, températures auxquelles ils sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette de la boîte.
- La solution de lavage et le réactif de blocage sont stables entre 2 et 30 °C jusqu'aux dates de péremption imprimées sur les étiquettes des flacons.
- Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (18–25 °C) avant utilisation. Après utilisation, tous les réactifs sauf la solution de lavage doivent être conservés entre 2 et 8 °C.
- Le pourcentage de récupération des concentrations des contrôles de la trousse doit se situer dans les limites fixées.
- Les barrettes de puits inutilisées doivent être replacées sur le support de conservation en plastique avec le sachet de dessiccant et conservées entre 2 et 8 °C.
- Ne pas utiliser des composants de la trousse au-delà de la date de péremption.
- Les informations sur le stockage et la stabilité des échantillons mentionnées plus haut sont des recommandations générales destinées à être utilisées dans différents types de laboratoires. Chaque laboratoire doit se conformer aux directives ou aux exigences de la réglementation locale, nationale et/ou fédérale, ou bien à celles des organismes d'accréditation pour définir ses propres procédures de manipulation des échantillons et de stabilité de stockage. Pour plus de détails sur les pratiques appropriées, merci de vous référer à CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

7 RECUEIL ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

- Aucune préparation particulière du patient n'est nécessaire.
- Un prélèvement de sang total doit être réalisé au moyen d'une technique médicale appropriée.
- Laisser le sang coaguler et séparer le sérum par centrifugation.
- Les échantillons doivent être prélevés de façon à éviter une hémolyse.
- Pour le test Ostase® BAP EIA, la nature de l'échantillon est le sérum. Les performances avec les échantillons plasmatiques n'ont pas été établies.
- Si l'échantillon de sérum doit être dosé dans les 24-48 heures qui suivent le prélèvement, le conserver dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C.
- Les échantillons conservés pendant des périodes plus longues (jusqu'à 39 mois) doivent être congelés à –80 °C.
- Les échantillons sériques troubles ou les échantillons contenant des particules doivent être centrifugés avant le dosage.

8 MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

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

9 PREPARATION DES REACTIFS

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

10 PROCEDURE

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

Le mode opératoire du test est le suivant:

1. Etiqueter correctement les supports/barrettes de puits du test et charger les barrettes sur le cadre support. Tester en double chacun des 6 étalons, le contrôle faible et le contrôle fort pour chaque dosage.
2. Pipeter 50 μL de l'Étalon zéro/des étalons B-F/des contrôles/des échantillons de patients dans le fond de chaque puits attribué.
3. Pipeter 100 μL de conjugué dans chaque puits.
4. Incuber 1 heure à 18–25 °C en utilisant un rotateur horizontal réglé entre 500 et 900 rpm.
5. Laver 3 fois les puits de la microplaque en:
 - a) Aspirant le liquide dans la première barrette.
 - b) Pipetant 300 μL de solution de lavage dans la première barrette
 - c) Répétant les étapes a et b sur toutes les barrettes suivantes.
 - d) Répétant 2 fois les étapes a et c.

6. Distribuer 150 µL de réactif substrat dans chaque puits. Passer sans attendre à l'étape suivante.
7. Incuber 13 à 15 minutes à 18–25 °C en utilisant un rotateur horizontal réglé entre 500 et 900 rpm. Passer sans attendre à l'étape suivante.
8. Distribuer 100 µL de réactif de blocage dans chaque puits.
9. Lire l'absorption de chaque puits à 405 nm dans un lecteur de microplaques, en soustrayant l'absorption d'un blanc lue à 600–650 nm pour chaque puits. Lire la plaque dans l'heure qui suit le blocage de la réaction.
10. Calculer les résultats de la façon décrite dans le paragraphe "Instruments et Calcul des Résultats".

11 REMARQUES CONCERNANT LE MODE OPERATOIRE

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

12 INSTRUMENTS ET CALCUL DES RESULTATS

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

12.1 Technique assistée par ordinateur

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

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

12.2 Méthode manuelle

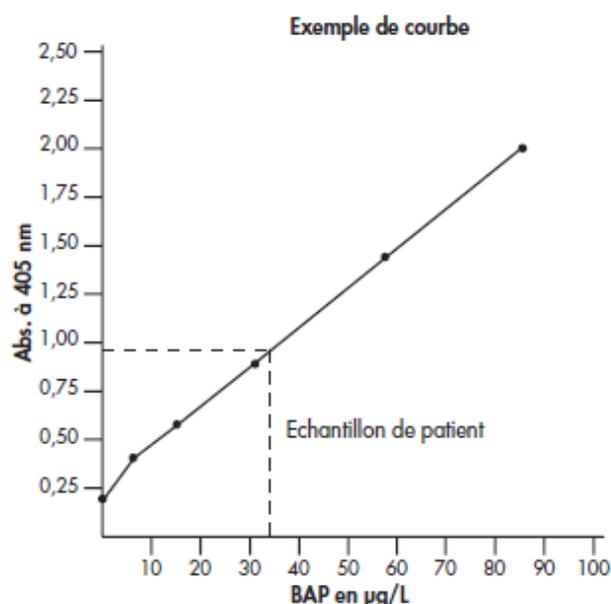
La courbe d'étalonnage du test Ostase® BAP EIA peut être construite manuellement sur du papier millimétré linéaire en reportant sur l'axe des ordonnées l'absorption moyenne de chaque étalon, en fonction de leur concentration en BAP portée sur l'axe des abscisses. Une courbe point-par-point doit être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

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

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

Exemple de résultats

Puits #	Description	Abs. à 405 nm	Abs. moyenne	BAP µg/L
1	Etalon (0)	0.193	0.190	0.0
2		0.187		
3	Etalon (1)	0.401	0.402	7.2
4		0.402		
5	Etalon (2)	0.595	0.584	15.5
6		0.572		
7	Etalon (3)	0.908	0.887	31.9
8		0.866		
9	Etalon (4)	1.499	1.479	58.4
10		1.460		
11	Etalon (5)	2.000	2.026	85.8
12		2.051		
13	Echantillon de patient	0.911		33.0



13 CONTROLE DE QUALITE ET ACCEPTABILITE DES RESULTATS

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

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

14 LIMITES DE LA TECHNIQUE

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

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

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

15 VALEURS ATTENDUES

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

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

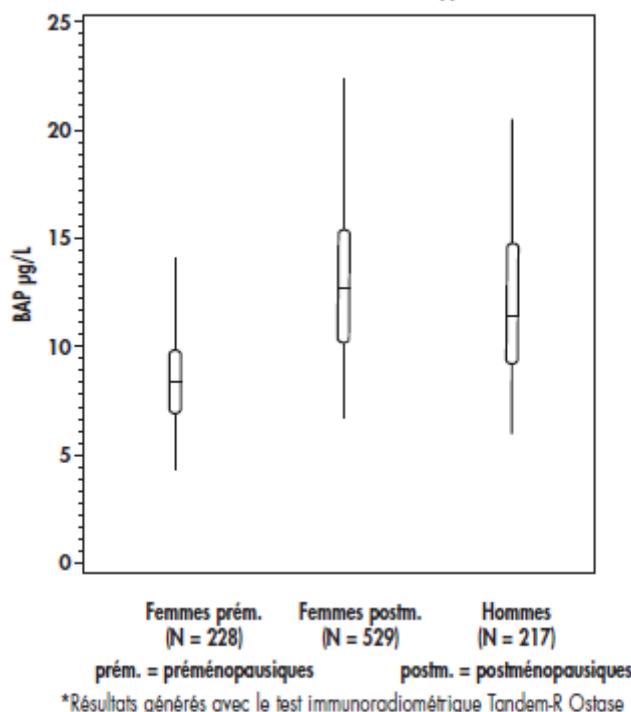
Résumé des concentrations de BAP chez des adultes apparemment en bonne santé.*

	N	Moyenne BAP µg/L	ET	Médiane BAP µg/L	Percentile 95 BAP µg/L
Hommes	217	12.3	4.3	11.6	20.1
Femmes préméno- pausiques	228	8.7	2.9	8.5	14.3
Femmes postméno- pausiques	529	13.2	4.7	12.5	22.4

* Résultats générés avec le test immunoradiométrique Tandem-R Ostase

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

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



Pour chacune des populations présentées dans le diagramme :

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

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

16 ETUDES CLINIQUES

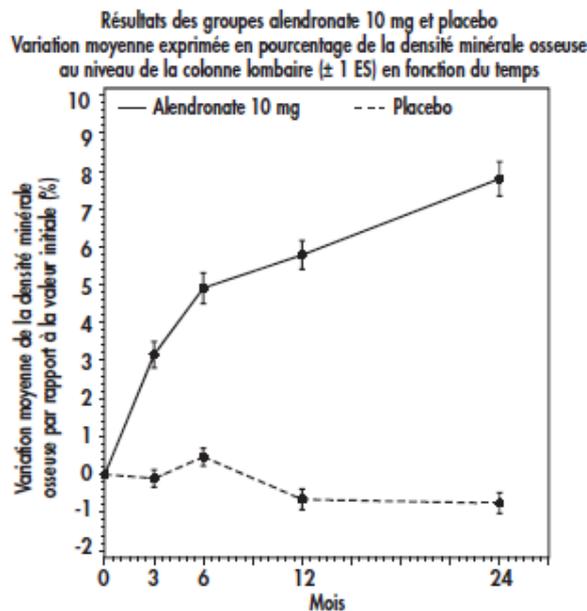
Maladie de Paget

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

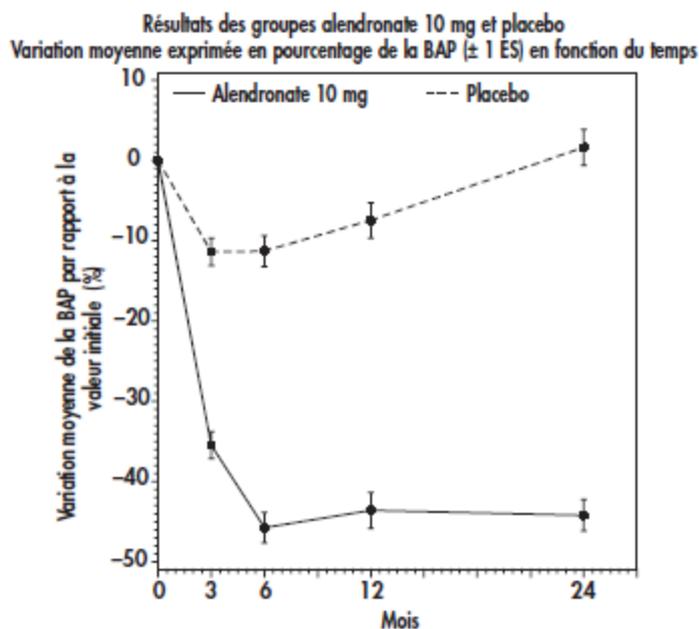
Ostéoporose postménopausique – Traitement par les biphosphonates

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

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



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



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

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

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

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

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

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

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

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

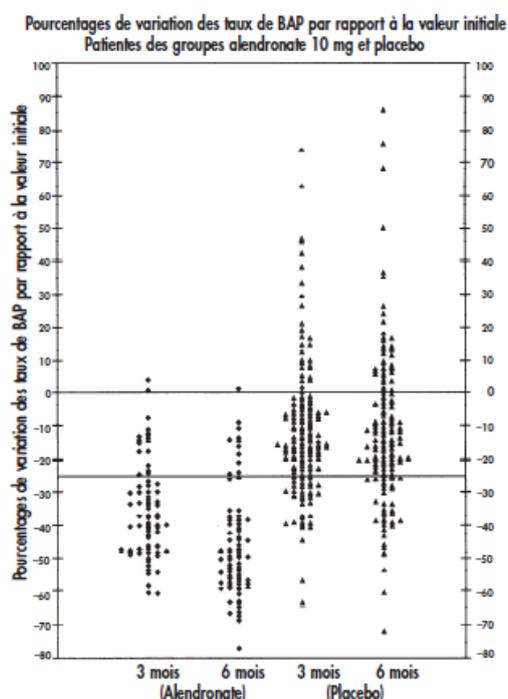
Les pourcentages de variation de la BAP par rapport à la valeur initiale de chaque patiente sont présentés ci-dessous. Les résultats sont donnés pour les sujets du groupe placebo et du groupe alendronate 10 mg après 3 mois et 6 mois de traitement. La ligne horizontale à zéro représente la valeur initiale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

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

Nombre de patientes/Nombre total de patientes

	3 mois		6 mois	
	Alendronate		Alendronate	
Valeur seuil des pourcentages de variation des taux de BAP	Placebo N = 148	10 mg N = 74	Placebo N = 148	10 mg N = 74
Diminution de 25 % ou supérieure	33/148 (22.3 %)	57/74 (77.0 %)	36/148 (24.3 %)	63/74 (85.1 %)
Diminution inférieure à 25 %	115/148 (77.7 %)	17/74 (23.0 %)	112/148 (75.7 %)	11/74 (14.9 %)

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



En résumé, il a été démontré que:

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

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

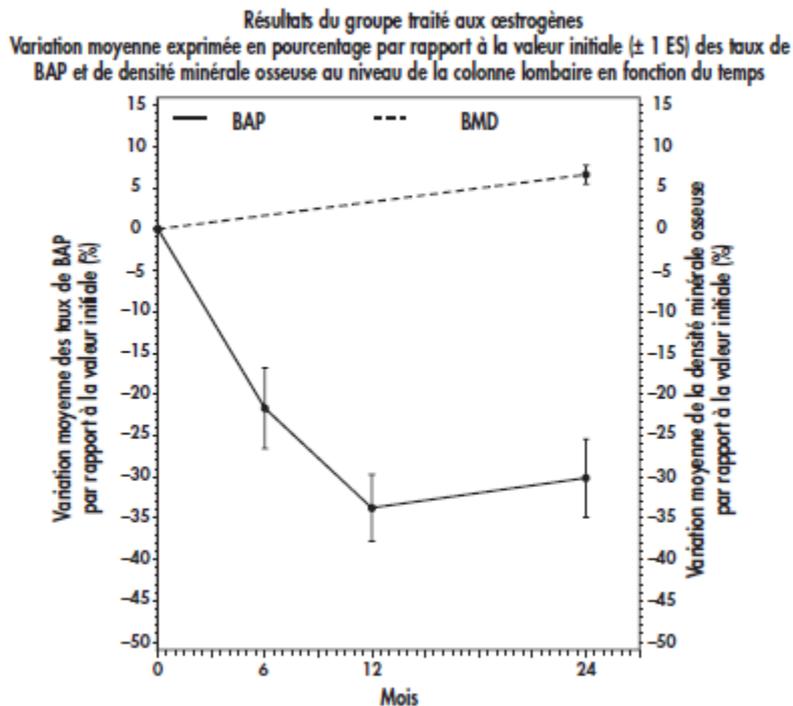
Femmes postménopausiques – Hormonothérapie substitutive

Outre l'étude sur les biphosphonates décrite ci-dessus, d'autres études ont été instaurées afin de démontrer la capacité du test Tandem Ostase à refléter les altérations du remodelage osseux consécutives à un traitement par des oestrogènes (29, 32). Les résultats de l'une de ces études sont présentés ci-des-

sous. Dans cette étude, des femmes (n = 12) postménopausiques non hystérectomisées apparemment en bonne santé, âgées de 65 à 75 ans, ont reçu quotidiennement un traitement oestroprogestatif (Prémairin 0,625 mg et Provera 2,5 mg) pendant 2 ans. De plus, 6 femmes hystérectomisées en bonne santé ont reçu uniquement des oestrogènes, ce qui donne, pour l'étude, une population totale de 18.

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

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



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

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

17 PERFORMANCES DU TEST

17.1 Précision intra-essai

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

Pool de sérums	1	2	3	4
Nombre de répliques	20	20	20	20
Moyenne (µg/L)	7.4	27.3	52.7	79.5
Ecart-type	0.48	0.78	1.35	3.54
CV %	6.5	2.9	2.6	4.5

17.2 Précision inter-essai

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

Pool de sérums	1	2	3	4
Nombre de répliques	20	20	20	20
Moyenne (µg/L)	8.4	29.2	55.6	81.1
Ecart-type	0.47	1.88	2.03	4.9
CV %	5.8	6.44	3.7	2

17.3 Récupération et dilution

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

Addition µg/L	Concentration attendue µg/L	Concentration attendue µg/L	Pourcentage de récupération*
14.0	24.6	24.8	100.9
39.9	50.5	48.8	96.6
59.2	69.8	66.0	94.6
92.2	102.8	92.6	90.1

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

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

Dilution	Concentration attendue µg/L	Concentration attendue µg/L	Pourcentage de récupération*
Pur	N/A	54.6	N/A
1:4	27.3	27.9	102.3
1:6	18.2	17.4	95.4
1:8	13.7	12.7	92.8

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

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

17.4 Substances interférant

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

17.5 Réactivité de la PAL hépatique

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

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

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

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

17.6 Substances interférant

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

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

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

17.7 Concentration minimale détectable

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

18 REFERENCES/BIBLIOGRAPHIE/LITERATUR

1. Riggs L. Causes of age-related bone loss and fractures, *Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment, and Treatment*. Deluca HF and Mazess R, eds., Elsevier (New York), pp. 7-16, 1990.
2. Status of Research in Osteoporosis. *Osteoporosis Research, Education and Health Promotion*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
3. Canalis E. Regulation of bone remodeling, *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Favus MJ, ed., Raven Press (New York), pp. 33-37, 1993.
4. Kleerekoper M and Avioli LV. Evaluation and treatment of postmenopausal osteoporosis, *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Favus MJ, ed., Raven Press (New York), pp. 223-229, 1993.
5. Lindsay R. *Osteoporosis. A Guide to Diagnosis, Prevention, and Treatment*. Raven Press (New York), pp. 1-39, 1992.
6. Epstein S. Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. *Endocrine Reviews* 9:437-448, 1988.
7. Whyte MP. Alkaline phosphatase and the measurement of bone formation, *Clinical Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. Potts JT and Frame B, eds., pp. 120-125, 1983.
8. Garnero P and Delmas P. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1046- 1053, 1993.
9. Cooper EH, Whelan P, and Purves D. Bone alkaline phosphatase and prostate-specific antigen in the monitoring of prostate cancer. *The Prostate* 25:236-242, 1994.
10. Van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, and Sanders GTB. Bone alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta* 201:27-33, 1991.
11. Merkow RL and Lane JM. Metabolic bone disease and Paget's disease in the elderly: II. Paget's Disease. *Clin Rheum Dis* 12:70, 1986.
12. Lindsay R. Sex steroids in the pathogenesis and prevention of osteoporosis, *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis, and Management*. Riggs L and Melton LJ, eds., Raven Press (New York), pp. 333-358, 1988.
13. Peck W. The pathogenesis of postmenopausal osteoporosis, *Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment*. Deluca HF and Mazess R, eds., Elsevier (New York), pp. 3-6, 1990.
14. Christiansen C. Osteoporosis: Diagnosis and management today. *Bone* 17:513S-516S, 1995.
15. Turner R, Riggs B and Spelsberg T. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Reviews* 15:275-300, 1994.
16. Kanis J. Pathogenesis of osteoporosis and fracture, *Osteoporosis*. London: Blackwell Science Ltd.; pp. 22-55, 1994.
17. Mack TM and Ross RK. A current perception of HRT risks and benefits, *Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment*. Deluca HF and Mazess R, eds., Elsevier (New York), pp. 161-178, 1990.
18. Riggs L and Melton LJ. The prevention and treatment of osteoporosis. *N Engl J Med* 327:620-627, 1992.
19. Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Prevention or Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products, Food and Drug Administration. April, 1994.
20. Ribot C, Tremollieres F and Pouilles JM. Prevention of postmenopausal bone loss by long-term parenteral administration of 17B estradiol: comparison of percutaneous and transdermal route, *Osteoporosis: Physiological Basis, Assessment and Treatment*. Deluca HF and Mazess R, eds., Elsevier (New York), pp. 137-145, 1990.
21. Delmas P. Biochemical markers of bone turnover. Methodology and clinical use in osteoporosis. *Am J Med* 91:59S-63S, 1991.
22. Duda RJ, O'Brien JF, Katzman JA, Peterson JM, Mann KG, and Riggs BL. Concurrent assays of circulating bone gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age, and metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 66:951-957, 1988.
23. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. 3rd edition. May 1993. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Washington, DC: US Government Printing Office, 1993.
24. Manual Guide – Safety Management No. CDC-22. Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts. April 30, 1976. Atlanta, GA: Centers for Disease Control.
25. Hill CS and Wolfert RL. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase. *Clin Chim Acta* 186:315-320, 1989.
26. Garnero P, Shih WJ, Gineyts E, Karpf DB, and Delmas PD. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1693-1700, 1994.

27. Liberman UA, Weiss SR, Broll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriquez-Portales J, Downs RW, Dequeker J, Favus M, Seeman E, Recker RR, Capizzzi T, Santora AC, Lombardi A, Shah RV, Hirsch LJ and Karpf DB. For the Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 333:1437-1443, 1995.
28. Dawson-Hughes B, Dallal GE, Krall EA, Sadowski L, Sahyoun N and Tannenbaum S. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *N Engl J Med* 323:878-883, 1990.
29. Reid IR, Ames RW, Evans MC, Gamble GD, and Sharpe SJ. Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Am J Med* 98:331-335, 1995.
30. Devogelaer JP, Broll H, Correa-Rotter R, Cumming DC, De Deuxchaisnes CN, Geusens P, Hosking D, Jaeger P, Kaufman JM, Leite M, Leon J, Liberman U, Menkes CJ, Meunier PJ, Reid I, Rodriguez J, Romanowicz A, Seeman E, Vermeulen A, Hirsch LJ, Lombardi A, Plezia K, Santora AC, Yates AJ and Yuan W. Oral alendronate induces progressive increases in bone mass of the spine, hip, and total body over 3 years in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 18:141-150, 1996.
31. Overgaard K, Alexandersen P, Riis BJ and Christiansen C. Evaluation of a new commercial IRMA for bone-specific alkaline phosphatase during treatment with hormone replacement therapy and calcitonin. *Clin Chem* 42:973-974, 1996.
32. Soletormos G, Schioler V, Nielsen D, Skovsgaard T, and Dombernowsky P. Interpretation of results for tumor markers on the basis of analytical imprecision and biological variation. *Clin Chem* 10:2077- 2083, 1993.
33. Blumsohn A, Hannon RA, Al-Dehaimi AW, and Eastell R. Short-term intraindividual variability of markers of bone turnover in healthy adults. *J Bone Min Res* 9:S153, 1994.
34. Raisz L, Wiita B, Artis A, Bowen A, Schwartz S, Trahiotis M, Shoukri K and Smith J. Comparison of the effects of estrogen alone and estrogen plus androgen on biochemical markers of bone formation and resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrin Metab* 81:37-43, 1996.
35. Kanis J. Treatment of generalized osteoporosis with inhibitors of bone resorption, Osteoporosis. London: Blackwell Science Ltd.; pp. 168-195, 1994.
36. Kennedy J, Carey R, Coolen R, Garber C, Hartman A, Lee H, Leitz V, Levine J, McLean M, Osberg I, Steindel S, and Sylvester E. User Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Tentative Guideline, NCCLS 4:8 EP5-T2, 1984.
37. Moss D and Whitby L. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chem Acta* 61:63, 1975.
38. Price C, Mitchell C, Moriarty J, Gray M and Noonan K. Mass versus activity of an immunometric assay for bone alkaline phosphatase in serum. *Ann Clin Biochem* 32:405, 1995.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts- kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
LOT	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité