Tandem®-R Ostase™: Ein neuer immunoradiometrischer Assay (IRMA) zur quantitativen Bestimmung der Skelett alkalischen Phosphatase

Tandem®-R Ostase™: a new immunoradiometric assay (IRMA) for the quantitative determination of alkaline phosphatase

M.-J. Yerna, C. Darte, M. Meyer, T. Scheele*

Hybritech Europe S.A., Lüttich, Belgien; *Hybritech GmbH, Köln

Einleitung

Die Messung der gesamt-alkalischen Phosphatase im Serum (AP) ist seit über 50 Jahren im allgemeinen klinischen Gebrauch. Ein Problem bei der Interpretation der AP-Ergebnisse ist jedoch die fehlende Spezifität aufgrund der kombinierten Isoenzymaktivitäten aus Knochen, Leber und Darm. Messungen des skelettalen Isoenzyms der AP (Skelett-AP) können durch eine Reihe verschiedener elektrophoretischer Techniken und Lektinbindungstrennverfahren der AP-Isoenzyme erfolgen. Diese Methoden sind sehr arbeitsaufwendig und die Ergebnisse in der Regel semiquantitativ. Vor kurzem hat Hybritech Inc., San Diego, USA, einen Immunoradiometrischen Assay (IRMA) für die quantitative Bestimmung der Skelett-AP vorgestellt. Der Assay nutzt zwei monoklonale Antikörper; er erfordert 0,1 ml Serum und ist mit einem Intraassay Variationskoeffizient von 7% und einem Interassay Variationskoeffizient von 8% sehr gut reproduzierbar. Die Verdünnung der erhöhten Patientenproben ergab ein lineares Verhalten mit einer Wiederfindung von 90-110%. Die Assaykalibration basiert auf einer Masseneinheit (µg/l), die unter Zuhilfenahme von Antigen aufgestellt wurde, welches bis zur Homogenität aus einer menschlichen Osteosarkomazellinie aufgereinigt wurde. Der Assay weist einen dynamischen Meßbereich bis 120 µg/l auf; die untere Nachweisgrenze beträgt 2 µg/l. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von 478 Proben gesunder Erwachsener betrugen 11,8 µg/l ± 4,3. Die Skelett-AP im Serum ist sehr stabil und zeigt keinen Verlust an Immunoreaktivität nach Kurzzeitexposition bei Raumtemperatur, Aufbewahrung im Kühlschrank oder Einfrieren über längere Zeit. Mehrere Gefrier- bzw. Auftauzyklen zeigten ebenfalls keinen Effekt. Untersuchungen zur analytischen Spezifität zeigten, daß der Assay eine siebenfache Präferenz für Knochen-AP gegenüber den Leberisoenzymformen im Serum hat. Wir schlußfolgern deshalb, daß der Tandem®-R Ostase™ Assay zuverlässige und reproduzierbare Charakteristika besitzt, die für den klinischen Einsatz wichtig sind.

Methoden und Ergebnisse

Zur Durchführung des Ostase-IRMA wuden:

- Jeweils 100 µl Nullstandard, Standard oder Probe in die entsprechenden Teströhrchen pipettieren.
- 100 µl Tracer (markierter Antikörper) in jedes Teströhrchen pipettieren.
- Die mit Antikörper beschichteten Polystyrolkugeln in jedes Teströhrchen geben.
- Inkubation über Nacht bei 2-8° C.
- Kugeln dreimal waschen und die Radioaktivität messen.

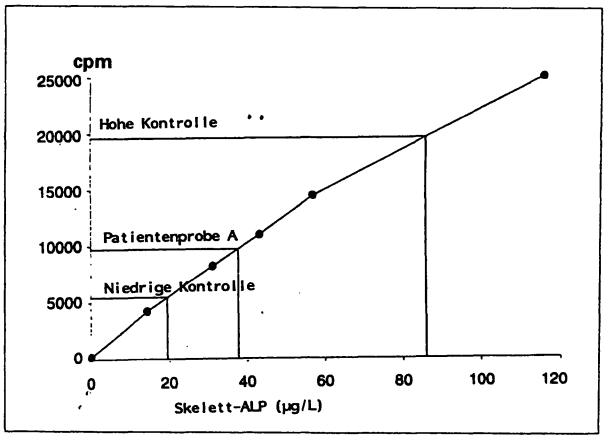

Abb. 1: Standardkurve des AP-IRMA

Erhöhte Patientenseren wurden mit Nullstandard verdünnt. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche prozentuale Wiederfindung, ± SD (n = 11) angegeben.

Die Ergebnisse sind als durchschnittliche, prozentuale Wiederfindung, ± SD (n=20) angegeben.

Tab. 1: Intra-Assay-Präzision des AP-IRMA

	Mittelwert µg/L	SD	% CV
Pool A	11.74	0.53	4.52
Pool B	48.27	2.00	4.15
Pool C	79.41	3.76	4.73

Tab. 2: Inter-Assay-Präzsion des AP-IRMA

	Mittelwert µg/L	SD	% CV
Pool 1	11.74	0.9	8.1
Pool 2	40.6	2.9	7.2
Pool 3	77.4	5.4	7.0

Tab. 3: Linearität des AP-IRMA

Verdünnung	Mittlere Wiederfindung %	SD
Neat		
1:1.5	101.8	3.8
1:2	99.0	2.9
1:3	99.1	4.3
1:4	99.5	5.7
1:5	102.0	4,2

Tab. 4: Probenstabilität

Aufbewahrungs-bedingungen	Mittlere Wiederfindung %	SD
Frische Proben	100	
Nach 24 h bei 4° C	96.9	0.1
Nach 48 h bei 4° C	99.7	0.1
Nach 72 h bei 4° C	97.1	0.2
1 Gefrier/Auftauzyklus	91.0	0.1
5 Gefrier/Auftauzyklen	104.5	0.1

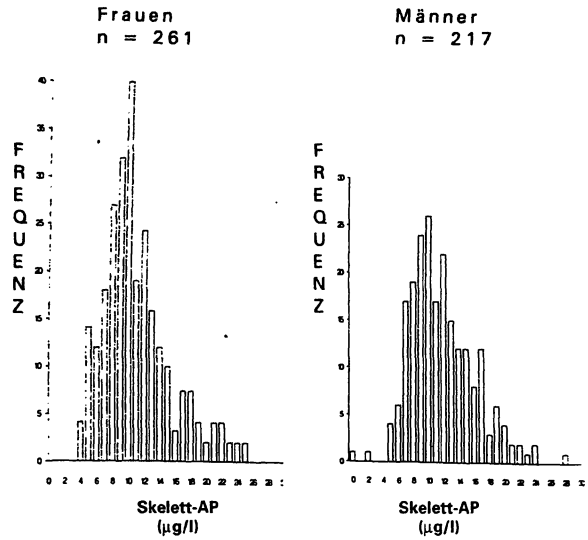

Abb. 2: Altersabhängige Verteilung der Skelett-AP gesunder Erwachsener

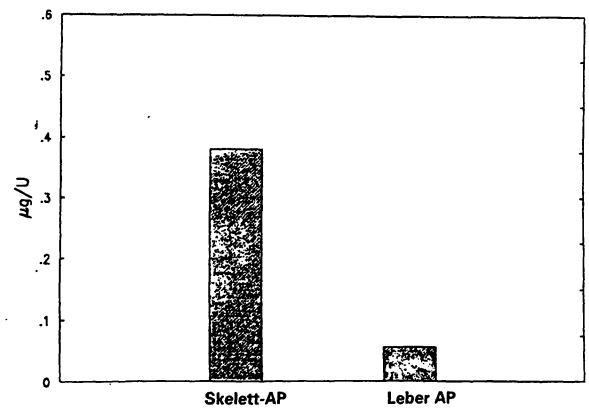

Abb. 3: Analytische Spezifität des AP-IRMA

Anschrift der Verfasser:

Hybritech GmbH
Emil-Hoffmann-Straße 7a
50996 Köln

Der Einsatz des Tandem®-R Ostase™-Assays zur Untersuchung der Skelett alkalischen Phosphatase beim metastasieren Brust- und Prostatakrebs

Use of Tandem®-R Ostase™ to study bone skeletal alkaline phosphatase in the metastatic spread of cancers of the breast and prostate

E.H. Cooper, M.A. Forbes, C. Darte*

School of Medicine, Universität von Leeds, England; *Hybritech Europe S.A., Lüttich

Einführung

Knochenmetastasen sind die häufigsten Fernmetastasen bei Brust- und Prostatakrebs. Die Serum-AP spiegelt dabei die erhöhte osteoblastische Aktivität wider, die im Knochen als Antwort auf Tumorzellwachstum oder Behandlung auftreten kann.

Jedoch kann Brustkrebs sowohl in die Leber als auch den Knochen metastasieren. Die Interpretation der AP-Ergebnisse ist wegen der fehlenden Spezifität und Sensitivität schwierig, da kombinierte Isoenzymaktivitäten von Knochen, Leber, Darm und anderen Geweben auftreten.

Messungen der Skelett-AP können durch verschiedene elektrophoretische und Lektinbindungstrennverfahren der AP-Isoenzyme durchgeführt werden, sie sind jedoch arbeitsintensiv und die Ergebnisse in der Regel semiquantitativ.

Kürzlich wurde ein neuer Immunoradiometrischer Assay (IRMA) für Skelett-AP im Serum unter Verwendung zweier monoklonaler Antikörper entwickelt (Tandem®-R Ostase™, Hybritech Inc., San Diego, USA).

Das Ziel der Untersuchung bestand darin, die Rolle des Tandem®-R Ostase™ Assays beim Monitoring metastatischer Erkrankungen des Skeletts bei Brust- und Prostatakrebs zu beurteilen und die Ergebnisse vergleichbaren Messungen des Tumormarkers Hybri-BREScan™ (CA 549) beim Brustkrebs und PSA beim Prostatakrebs gegenüberzustellen.

Das CA 549-Antigen mit Hybri-BREScan™ (Tandem®-R CA 549) das PSA mit Tandem®-R PSA Assays und die Skelett-AP mit Tandem®-R Ostase™ gemessen.

Ergebnisse

Die Konzentrationen der Skelett-AP bei tumorfreien, metastasenfreien und metastasierten Patientinnen und Patienten mit Brust- und Prostatakrebs sind in Tab. 1 + 2 aufgezeigt.

Tab. 1: Verteilung der Skelett-AP beim Brustkrebs

SKELETT-AP (µg/l)					
Status	n	Median	Q1	Q3	Bereich
Tumorfrei	20	7.6	4.6	9.6	4.0-13.9
Metastasen-frei	20	6.7	5.0	7.7	3.1-13.3
Begrenzte Knochen-metastasen	16	10.5	6.8	12.1	5.0-39.9
Ausgedehnte Knochen-metastasen	33	18.6	11.1	35.0	4.0-87.0
Keine	25	8.4	5.9	13.3	3.4-61.9

Tab. 2: Verteilung der Skelett-AP beim Prostatakrebs

SKELETT-AP (µg/l)				
Status	n	Median	Q1	Q3
Metastasen-frei	10	10.5	8.2	13.0
Metastasen PSA (ng/ml)				
< 20*	34	12.5	10.5	22.0
< 100**	27	16.0	9.5	35.7
100-500**	22	41.0	17.5	53.5
> 500**	21	60.0	30.0	213.0

** Patienten im Remissionsstadium*
*** Erkrankung im fortgeschrittenen Stadium*

Schlußfolgerungen

- Die Serum-Skelett-AP reflektiert die Osteoblastenaktivität der Knochenmetastasen beim Brust- und Prostatakrebs.
- Die Skelett-AP-Werte können das Ansprechen auf die Therapie widerspiegeln.
- Die zeitliche Entwicklung der Skelett-AP, des CA 549-Antigens oder des PSA gehen generell in die gleiche Richtung, jedoch nicht immer gleichzeitig.
- Tandem®-R Ostase™ ist eine sensitive Methode zur Untersuchung biochemischer Knochenveränderungen, die durch Metastasen eines Brust- oder Prostatakrebses hervorgerufen werden.

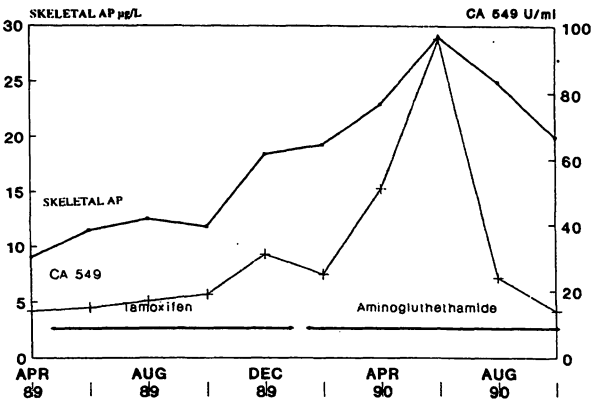

Abb. 1: Verlauf von Skelett-AP und CA 549 bei Brustkrebs und Knochenmetastasen. Gleichzeitiger Anstieg beider.

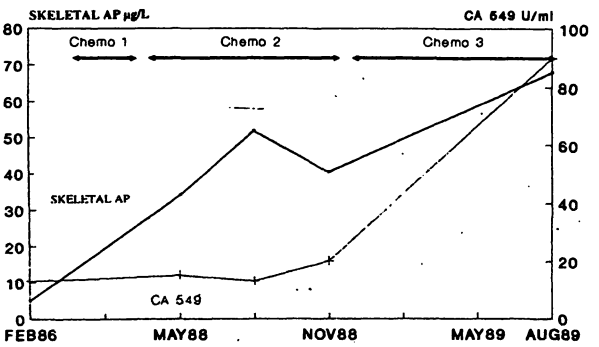

Abb. 2: Verlauf von Skelett-AP und CA 549 bei Brustkrebs und Knochenmetastasen. Die Skelett-AP steigt früher an als CA 549.

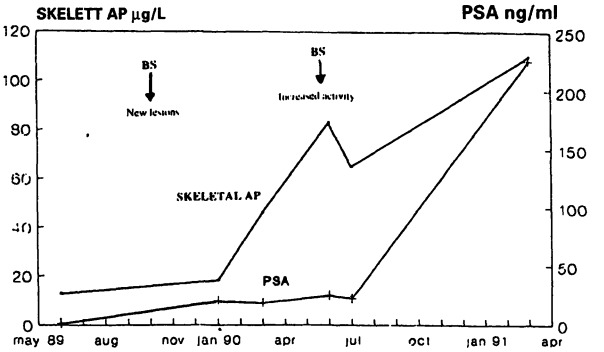

Abb. 3: Verlauf von Skelett-AP und PSA bei Prostatakrebs mit Knochenmetastasen. Skelett-AP steigt früher an als PSA.

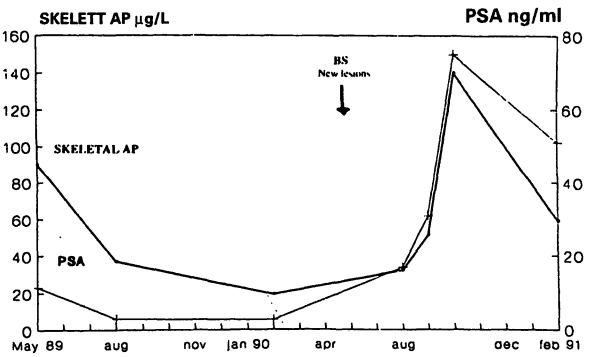

Abb. 4: Verlauf von Skelett-AP und PSA bei Prostatakrebs mit Knochenmetastasen. Gleichteitiger Anstieg beider.

Anschrift der Verfasser:

Hybritech GmbH
Emil-Hoffmann-Straße 7a
50996 Köln

Stabilität des doppelt-monoklonalen Tandem®-PSA Assays

Stability of the double-monoclonal Tandem®-PSA assay

M. Meyer, C. Darte, M. Wilmet, T. Scheele*

Hybritech Europe S.A., Lüttich, Belgien; *Hybritech GmbH, Köln

Einführung

Der Prostatakrebs ist wahrscheinlich der am langsamsten wachsende Epithelkrebs. Dies stellt eine ernste analytische und klinische Herausforderung dar. Die Überwachung der Prostatakrebspatienten über einen längeren Zeitraum, vorzugsweise über mehrere Jahre, erfordert eine hervorragende Stabilität des Assays. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern zur Messung von PSA bietet die beste Voraussetzung für eine exakte Langzeitüberwachung bei Prostatakrebspatienten.

Die Studie wurde durchgeführt, um

- die außergewöhnliche Langzeitstabilität der Tandem®-R und Tandem®-E PSA Assays zu demonstrieren,
- den Klinikern zu zeigen, daß ihnen dadurch äußerst genaue und klinisch relevante Ergebnisse zur Verfügung stehen und somit einen Beitrag zur besseren Patientenbetreuung zu leisten.

Anschrift der Verfasser:

Hybritech GmbH
Emil-Hoffmann-Straße 7a
50996 Köln

Material und Methode

Vier menschliche Serumpools und zwei kommerzielle Laborkontrollen im Bereich von 0,7 bis 76 ng PSA/ml wurden prospektiv zwischen April 1987 und August 1992 gemessen.

Ergebnisse

Die dual-monoklonalen Tandem®-R und Tandem®-E PSA Assays waren in über 100 unterschiedlichen Chargen genau und stabil (Abb. 1). Dies spiegelt ein ungewöhnlich kleiner Variationskoeffizient wider. Der mittlere Variationskoeffizient lag bei Tandem®-R PSA zwischen 2,0% und 4,2% und bei Tandem®-E PSA zwischen 3,5% und 6,8%.

Aufgrund der beschriebenen Zuverlässigkeit und Stabilität von Tandem®-R und Tandem®-E PSA kann der Kliniker sicher sein, daß Veränderungen in den PSA-Konzentrationen durch eine Änderung des klinischen Status beim Patienten und nicht durch die Assayvariabilität verursacht werden.

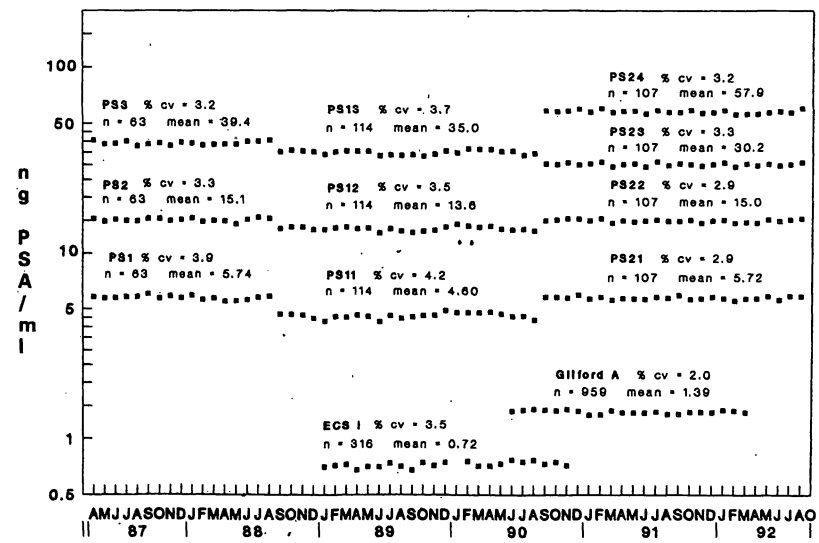

Abb. 1: Hybritech Tandem®-R PSA – Stabilität der Werte (1987-1992). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert der Messungen des betreffenden Monats.