

**medac Asparaginase-Aktivitäts-Test**  
**MAAT**

Deutsch



## **HERSTELLER**

### **medac**

Gesellschaft für klinische  
Spezialpräparate mbH  
Theaterstraße 6  
D-22880 Wedel

www.medac-diagnostika.de  
E-Mail: diagnostics@medac.de  
Tel.: ++49/4103/8006-0  
Fax: ++49/4103/8006-359

## **BESTELLADRESSE**

E-Mail: auftrag@medac.de  
Tel.: ++49/4103/8006-111  
Fax: ++49/4103/8006-113

## **medac Asparaginase-Aktivitäts-Test (MAAT)**

Quantitativer Enzymtest zur Bestimmung der Asparaginase-Aktivität in Serum und EDTA-Plasma

Katalog-Nr.: 550

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

### **EINFÜHRUNG**

Das Enzym L-Asparaginase ist ein zentraler Bestandteil in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) bei Kindern und Erwachsenen.

Das Wirkprinzip der Asparaginase-Therapie besteht in der enzymatischen Spaltung der Aminosäure Asparagin in Asparaginsäure und Ammoniak, mit nachfolgender Depletion von Asparagin im Blutplasma und Liquor (s. auch Testprinzip: Seite 2).

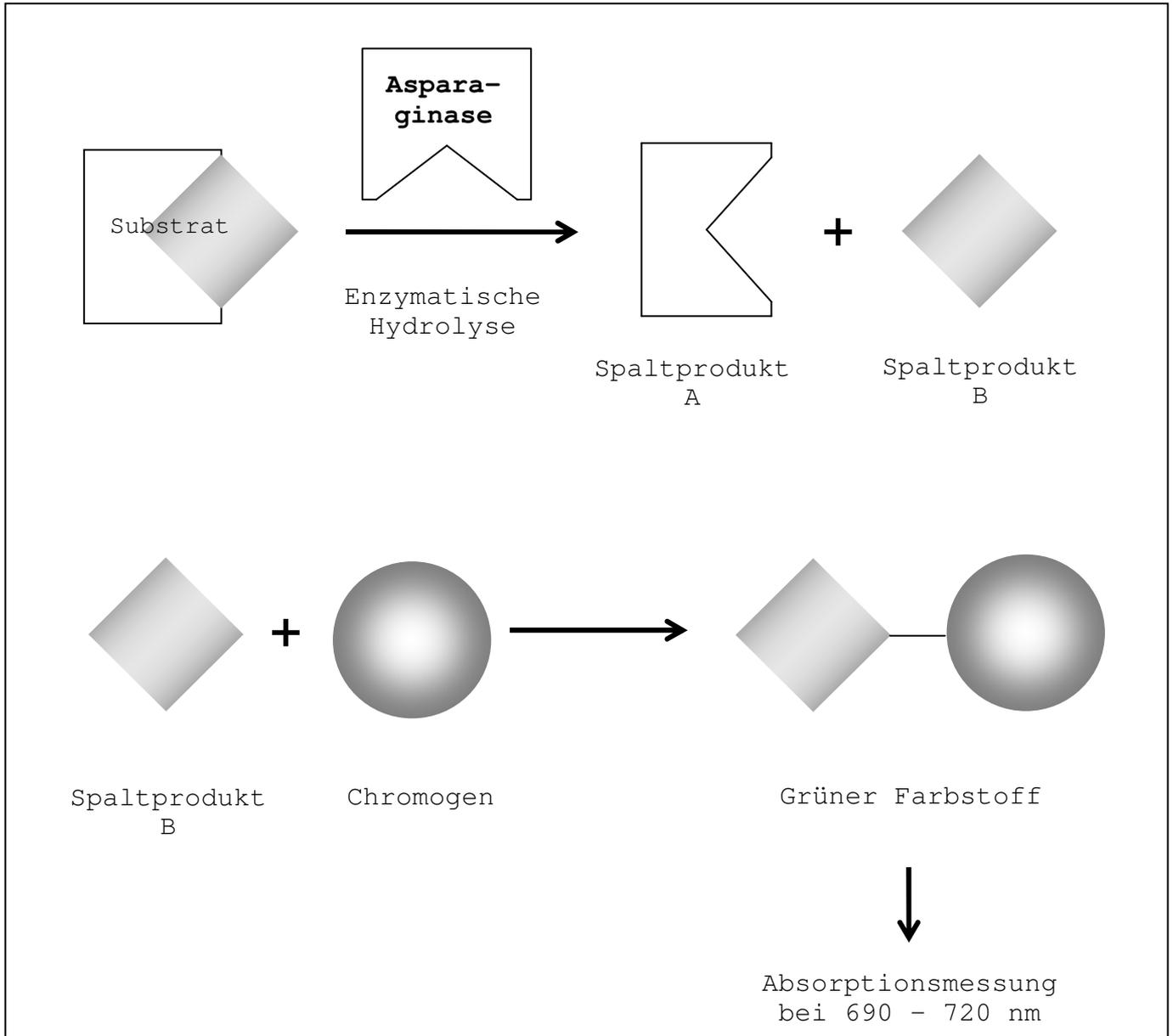
Mit Hilfe des vorliegenden Testkits ist es möglich, die Asparaginase-Aktivität im Verlauf der Therapie zu messen, um so eine optimierte Asparaginase-Therapie durchführen zu können.

Die Zielsetzung dieses Asparaginase-Aktivitätsmonitorings ist:

- \* Kontrolle des Asparaginase-Aktivitäts-Spiegels während der Therapie als Surrogatparameter für die Asparagin-Depletion.
- \* Detektion einer durch Immunresponse hervorgerufenen „silent inactivation“ und die dadurch verursachte Verkürzung der Wirksamkeitsdauer des Asparaginase-Präparates.
- \* Rationale Entscheidungsgrundlage für einen evtl. notwendigen Einsatz eines alternativen Asparaginase-Präparates oder einer eventuell notwendigen Anpassung der Dosierung.

Der MAAT-Assay ist ein homogener Test zur Messung der Asparaginase-Aktivität, der es ermöglicht, die Zielsetzungen eines Asparaginase-Aktivitäts-Monitorings voll zu erfüllen.

## TESTPRINZIP



Asparaginase spaltet ein asparaginanalogenes Substrat in 2 Spaltprodukte A und B.

Das freigesetzte Spaltprodukt B bildet in einer komplexen Reaktion mit einem Chromogen einen grünen Farbkomplex, der durch Absorptionsmessung nachgewiesen werden kann.

Die optische Dichte wird bei 690 - 720 nm gemessen, die Asparaginase-Aktivität ist mit Hilfe einer Standardkurve zu ermitteln.

## Testvorteile

- ◆ Flexibles Handling durch einzeln brechbare Kavitäten
- ◆ Einfaches Handling, da keine Wasch- und Zentrifugierschritte
- ◆ Testdauer von nur ca. 2,5 Stunden
- ◆ Hohe Präzision der Meßergebnisse mit Asparaginase medac®

## PACKUNGSINHALT:

### KAT.-NR.: 550

1. Mikrotiterplatte: 6 Teststreifen à 8 Vertiefungen (mit Halterahmen im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, spezialbehandelt.
2. Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,5 ml, Asparaginase medac® aus *E. coli* in humanem Serum, lyophilisiert.
3. Standards: je 2 Fläschchen à 0,5 ml, Asparaginase medac® aus *E. coli* in humanem Serum, lyophilisiert:
  - 3a. Standard 1: 600 U/L
  - 3b. Standard 2: 300 U/L
  - 3c. Standard 3: 50 U/L
  - 3d. Standard 4: 0 U/L
4. Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, 0,01 M PBS/TWEEN/BSA, pH 7,2 - 7,4, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300 (0,008 % CMIT/MIT)<sup>1</sup>.
5. Substrat: 2 Fläschchen à 0,75 ml, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300 (< 0,0015 % CMIT/MIT)<sup>1,2</sup>.
6. Chromogen: 2 Fläschchen à 1,0 ml, konzentriert.  
Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.  
Freisetzung in die Umwelt vermeiden.  
Inhalt/Behälter gemäß lokalen und nationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.
7. Chromogenverdünner: 2 Fläschchen à 2,0 ml, gebrauchsfertig.  
Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.



<sup>1</sup> Gemisch aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1).

<sup>2</sup> Kann allergische Reaktionen hervorrufen. Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich (s. CD-ROM).

## **1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT**

<b>Material/Reagenz</b>	<b>Zustand</b>	<b>Lagerung</b>	<b>Haltbarkeit</b>
Testkit	ungeöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2...8 °C im Beutel mit Trockenmittelpappe	bis Verfalldatum
Kontrolle	geöffnet, gelöst	2...8 °C	4 Wochen
Standards	geöffnet, gelöst	2...8 °C	4 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	8 Wochen
Substrat	geöffnet	2...8 °C	4 Wochen
Chromogen	geöffnet	2...8 °C	4 Wochen
Chromogenverdünner	geöffnet	2...8 °C	4 Wochen

Die Reagenzien sind nach Ablauf des angegebenen Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.

## **2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN**

- 2.1. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.2. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Proben und Chromogen.
- 2.3. Mikrotiterplatten-Photometer mit einem Filter für 690 - 720 nm.

## **3. ANSETZEN DER REAGENZIEN**

Alle Kitkomponenten müssen vor Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Mikrotitervertiefungen.

### 3.1. Mikrotiterplatte

Der Aluminiumbeutel sollte nach jeder Entnahme von Mikrotitervertiefungen zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen siehe Tabelle Seite 4.

### 3.2. Standards und Kontrolle

Die lyophilisierten Kontrolle und Standards werden mit jeweils 0,5 ml des Probenverdünnungspuffers rekonstituiert. Die verschlossenen Fläschchen werden leicht geschwenkt, so daß auch am Verschuß haftende Partikel in Lösung gebracht werden.

### 3.3. Chromogenlösung

Das Chromogen wird mit Chromogenverdünner im Verhältnis 1 + 2 gemischt. Für 8 Vertiefungen werden 800 µl Chromogenlösung benötigt.

Beispiele:

Anzahl der Vertiefungen	Chromogen (µl)	Chromogenverdünner (µl)	Σ (µl)	benötigtes Pipettiervolumen (µl)
6	240	480	720	600
7	280	560	840	700
8	320	640	960	800
9	360	720	1080	900
10	400	800	1200	1000
11	440	880	1320	1100
12	480	960	1440	1200
13	520	1040	1560	1300
14	560	1120	1680	1400
15	600	1200	1800	1500
16	640	1280	1920	1600

Hinweis: Beim Mischen tritt eine Erwärmung der Chromogenlösung auf.

Die Mischung aus Chromogen und Chromogenverdünner ist nicht lagerfähig und muß sofort verwendet werden.

**Die Reagenzien einer Charge sind nicht mit Reagenzien anderer Chargen oder anderer Hersteller zu mischen.**

**Nur bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschrift und bei Verwendung der Testkit-spezifischen Reagenzien werden valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.**

#### **4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL**

- 4.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum und EDTA-Plasma. Die Patientenproben können für 7 Tage bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung sollte bei  $\leq -20$  °C erfolgen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben ist zu vermeiden.
- 4.2. Eine Vorbehandlung der Proben, wie z. B. Inaktivierung, darf nicht erfolgen, sie sollten nicht mikrobiell kontaminiert, nicht lipämisch und frei von Humanerythrocyten sein.
- 4.3. Die Proben werden 1:10 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt (z. B. 20 µl Probe + 180 µl Probenverdünnungspuffer). Proben außerhalb des Meßbereiches können beliebig weiterverdünnt werden.

#### **5.A. ARBEITSVORSCHRIFT**

- 5.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s. 3.1.).
- 5.2. Jeweils 20 µl der Kontrolle, der Standards und der Proben in die Vertiefungen der Platte pipettieren.
- 5.3. Danach jeweils 20 µl Substrat in alle Vertiefungen zupipettieren.

**Das Pipettieren der Standards, Kontrolle, Proben und des Substrats sollte innerhalb von 10 min erfolgen. Durch vorsichtiges Schütteln ist für gleichmäßige Durchmischung zu sorgen. Anschließend ist die Platte unverzüglich zu inkubieren.**

- 5.4. Die Mikrotitervertiefungen 60 min ( $\pm 2$  min) bei Raumtemperatur (22 °C  $\pm$  1 °C) abgedeckt inkubieren.
- 5.5. Gegen Ende der Inkubationszeit die Chromogenlösung ansetzen (s. 3.3.).
- 5.6. 100 µl der Chromogenlösung in alle Mikrotitervertiefungen pipettieren.
- 5.7. Die Mikrotitervertiefungen 90 min ( $\pm 2$  min) bei Raumtemperatur (22 °C  $\pm$  1 °C) abgedeckt inkubieren.

**Durch vorsichtiges Schütteln für gleichmäßige Durchmischung sorgen.**

**Vor photometrischer Messung darauf achten, daß keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind.**

**Die Messung ist unverzüglich nach Beendigung des letzten Inkubationschrittes durchzuführen.**

## **5.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT**

	Standards	Kontrolle	Probe
Standards	20 µl	-	-
Kontrolle	-	20 µl	-
Probe	-	-	20 µl
Substrat	20 µl	20 µl	20 µl
Inkubation 60 min, Raumtemperatur (22 ± 1 °C)			
Chromogenlösung	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation 90 min, Raumtemperatur (22 ± 1 °C)			
Photometrische Auswertung bei 690 - 720 nm			

## **6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)**

- \* Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 690 - 720 nm. Der Blankwert wird gegen Luft gemessen.
- \* Der Sollwertbereich der Kontrolle ist dem jeweiligen Boxlabel zu entnehmen.
- \* Validitätskriterien
  - Die Aktivität der Kontrolle muß innerhalb des Sollwertbereiches (siehe Aufdruck auf dem Boxlabel) liegen.
  - Der OD-Wert des **Standards 1** muß > **1,500** betragen.
  - Der OD-Wert des **Standards 4** muß < **0,150** betragen.

**Sind die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden.**

- \* Standardkurve und Quantifizierung der Meßergebnisse

Die OD-Werte der Standards werden gegen die Aktivität aufgetragen. Für die Standardkurve wird empfohlen, eine kubische Spline-Anpassung durchzuführen.

Für die OD-Werte der Proben können die Asparaginase-Aktivitäten aus der Standardkurve abgelesen werden.

Der Meßbereich erstreckt sich von 30 bis 600 U/L. Proben mit Aktivitäten unterhalb des Meßbereiches sind als < 30 U/L zu bewerten. Proben oberhalb des Meßbereiches sind als > 600 U/L zu bewerten. Diese dürfen nicht extrapoliert werden, sondern sollten in höherer Verdünnung wiederholt getestet werden.

Wurde eine Probe in einer höheren Verdünnung als 1:10 gemessen, ist die aus der Standardkurve ermittelte Konzentration mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor zu multiplizieren (z. B.: Verdünnung im Test 1:40, abgelesene Aktivität 250 U/L  $\Rightarrow$  tatsächliche Aktivität = 250 U/L  $\times$  4 = 1000 U/L).

## **6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE**

- \* Mit Hilfe des medac Asparaginase-Aktivitäts-Tests (MAAT) kann die Asparaginase-Aktivität von asparaginabbauenden Enzymen gemessen werden. Dies gilt für die Asparaginase-Aktivität aller im Handel befindlichen Asparaginase-Präparate.
- \* Die Kalibrierung des Tests erfolgt gegen Asparaginase medac<sup>®</sup>, so dass Proben von Patienten, die mit Asparaginase medac<sup>®</sup> therapiert werden, akkurat bewertet werden. Die Validierung erfolgte im Vergleich zu einer Referenzmethode (AHA-Test, s. Lanvers et al., 2002).
- \* Aufgrund der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Meßmethode kann es bei der Messung von Proben, welche andere Asparaginase-Präparate enthalten, zu systematischen Abweichungen der gemessenen Aktivität kommen. Zur Bestimmung dieser Abweichung für Oncaspar<sup>®</sup> wurde parallel zur AHA-Referenzmethode eine entsprechende Vergleichsuntersuchung für Proben von Patienten, die mit Oncaspar<sup>®</sup> therapiert wurden, durchgeführt. Diese ergab eine im Mittel um 24 % erhöhte Aktivität (s = 10 %; N = 134). Zur Qualitätssicherung und Überprüfung der angestrebten Dosisintensität während der Therapie sind diese in der Regel geringfügigen Abweichungen zu vernachlässigen.

- \* Nach den derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnissen gibt es keinen eindeutigen Grenzwert der Asparaginase-Aktivität, ab dem eine 100 %ige Asparagin-Depletion gewährleistet ist. Deshalb sollte der jeweilige Grenzwert entsprechend des Therapieziels vom Anwender bzw. der jeweiligen Studiengruppe selbst definiert werden. Die Publikation von Riccardi et al. (1981) weist jedoch darauf hin, dass ab einer Asparaginase-Aktivität > 100 U/L eine vollständige Asparagin-Depletion gewährleistet ist, so dass die Aktivität von 100 U/L als „sinnvolle, minimale Aktivität“ angesehen werden kann.
- \* Hohe Hämoglobin- und Bilirubinkonzentrationen beeinflussen die Testergebnisse nicht.

## **7. LEISTUNGSMERKMALE**

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der diagnostischen Evaluierung ermittelt.

### **7.A. PRÄVALENZ**

Im Rahmen der diagnostischen Erprobung wurden 102 Seren von Blutspendern gemessen. In diesen Seren waren keine Asparaginase-Aktivitäten meßbar. Die Asparaginase-Aktivität lag generell unter 30 U/L.

Es wurden außerdem 52 Kinderseren auf Asparaginase-Aktivität untersucht. Die Werte lagen auch hier unter 30 U/L.

### **7.B. PRÄZISION**

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz			
	MW OD	S	VK (%)	n		MW U/L	S	VK (%)	n
<b>Std. 1</b>	2,162	0,068	3,1	22	<b>K</b>	91,5	3,7	4,0	9
<b>K</b>	0,530	0,006	1,1	22	<b>Nr. 3</b>	38,2	1,7	4,5	9
<b>Nr. 1</b>	0,254	0,006	2,5	22	<b>Nr. 4</b>	125,5	7,5	6,0	9
<b>Nr. 2</b>	1,380	0,021	1,5	22	<b>Nr. 5</b>	420,3	33,7	8,0	9

Std. = Standard; K = Kontrolle; Nr. = Serum

### **7.C. WIEDERFINDUNG**

Durch Zugabe von jeweils 3 definierten Asparaginase-Aktivitäten (Asparaginase medac®) zu 3 verschiedenen Seren wurde eine mittlere Wiederfindung von 93,6 % (S = 9,9 %) ermittelt.

### **7.D. VERDÜNNUNGSLINEARITÄT**

Die Verdünnungslinearität wurde anhand von 10 hochreaktiven Seren, die in 4 - 5 verschiedenen Verdünnungen (jeweils 1:2 weiterverdünnt) getestet wurden, überprüft.

	<b>Verd. 1</b>	<b>Verd. 2</b>	<b>Verd. 3</b>	<b>Verd. 4</b>	<b>Verd. 5</b>	<b>MW</b>	<b>S</b>	<b>VK</b>
	<b>U/L</b>	<b>U/L</b>	<b>U/L</b>	<b>U/L</b>	<b>U/L</b>	<b>U/L</b>	<b>U/L</b>	<b>%</b>
<b>Nr. 1</b>	1731	1789	1845	1897	-	1815	71	3,9
<b>Nr. 2</b>	440	446	465	476	-	457	17	3,6
<b>Nr. 3</b>	1569	1638	1665	1672	-	1636	47	2,9
<b>Nr. 4</b>	359	357	373	375	-	366	9	2,5
<b>Nr. 5</b>	373	380	407	404	-	391	17	4,4
<b>Nr. 6</b>	543	520	546	564	614	557	35	6,3
<b>Nr. 7</b>	940	945	972	979	-	959	19	2,0
<b>Nr. 8</b>	8876	8889	9248	8986	9125	9025	160	1,8
<b>Nr. 9</b>	3609	3775	4025	4273	-	3920	291	7,4
<b>Nr. 10</b>	1087	1068	1116	1153	-	1106	37	3,4

### **7.E. HOOK-EFFEKT**

Bei Asparaginase-Aktivitäten bis zu 20 000 U/L wurde kein Hook-Effekt beobachtet.

### **7.F. BESTIMMUNGSGRENZE (LIMIT OF QUANTITATION, LOQ)**

Die Bestimmungsgrenze beträgt 30 U/L.

## **ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE**

- \* Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- \* Sofort nach Gebrauch die Reagenzflaschen wieder fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- \* Nach Gebrauch sind die Reagenzien sofort wieder, entsprechend den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, zu lagern, um die angegebene Haltbarkeit zu gewährleisten.
- \* Um Verwechslungen mit Reagenzien anderer Testsysteme oder Chargen zu vermeiden, sollten alle Kitkomponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

## **SICHERHEITSHINWEISE**

- \* Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- \* Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden auf HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Dennoch sollten diese Reagenzien wie auch jene, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

## **ENTSORGUNGSHINWEISE**

Die in diesem Produkt enthaltenen Chemikalien und Zubereitungen sowie die bei der Anwendung dieses Produktes anfallenden Reste sind in der Regel Abfälle, die einer ordnungsgemäßen Entsorgung zugeführt werden müssen.

Die Entsorgung solcher Abfälle unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde oder Abfallbeseitigungsunternehmen informieren über die Entsorgung von Sonderabfällen.

**Ausgabedatum : 01.04.2018**

## **LITERATUR**

Boos et al., Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations; *European Journal of Cancer*, Vol. 32 A, No. 9, pp. 1544-1559 (1996).

Boos J. medac Asparaginase-Activity-Test (MAAT): A new method to measure asparaginase activity; I-BFM-Meeting, Prag (2001).

Lanvers et al., Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L-asparaginase in human serum; *Analytical Biochemistry*; 309, 117-126 (2002).

Mueller et al., Pegylated asparaginase (Oncaspar) in children with ALL: drug monitoring in reinduction according to the ALL/NHL-BFM protocols; *British Journal of Hematology*, 110, 379-384 (2000).

Riccardi R, Holcenberg JS, Glaubinger DL, et al., L-Asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans; *Cancer Res*; 41: 4554-4558 (1981).