



QUIDEL

MicroVue™ Bone

TRAP5b EIA

Enzimoimmunoensayo para la determinación de la isoforma 5b de la fosfatasa ácida resistente a tartrato en suero humano o plasma

Para uso diagnóstico *in vitro*. Solo para exportación. No apto para la venta o uso en Estados Unidos o Canadá.

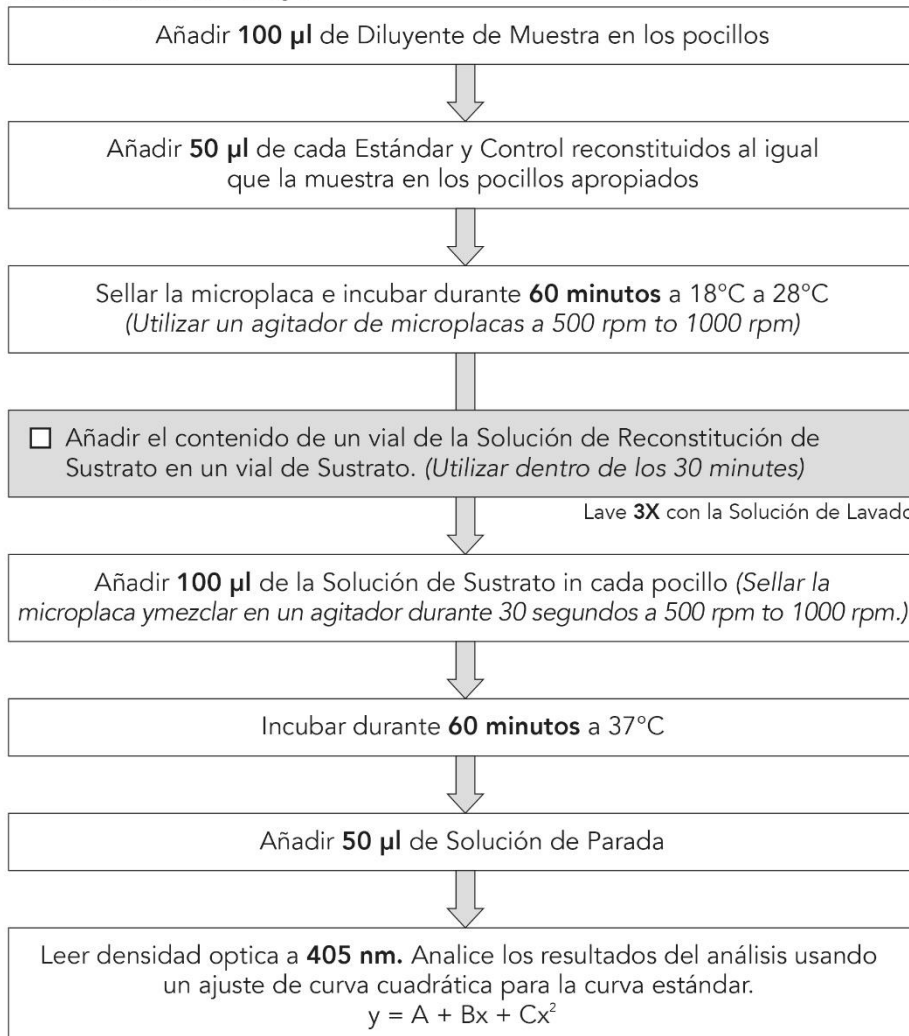
RESUMEN

Preparación del Reactivo y del Control

- Reconstituir cada Estándar con 400 µl de agua desionizada (destilada).
(Deben ser utilizados en 2 horas)
- Reconstituir cada Control con 400 µl de agua desionizada (destilada).
(Deben ser utilizados en 2 horas)
- Diluir la 10X Solución de Lavado 1:10 con agua desionizada (destilada).

NOTA: Mezclar a fondo con la pipette; no haga el vórtice.

Procedimiento de ensayo





USO PREVISTO

El ensayo MicroVue TRAP5b es un enzimoimmunoensayo para la determinación de la isoforma 5b de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAcP 5b). TRAP5b es secretada al suero a partir de los osteoclastos del hueso en resorción y es un indicador de la actividad de osteoclastos *in vivo*. Los valores de la actividad de TRAP5b pueden ser un indicador útil de la actividad de los osteoclastos y por lo tanto la resorción ósea en osteoporosis primaria y otras enfermedades.¹⁻⁶

CARACTERÍSTICAS

- El tiempo total del ensayo es de dos horas.
- El kit mide únicamente la actividad enzimática de la TRAP5b enzima.
- Las muestras no requieren pre-dilución.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

TRAP5b (banda 5 en suero de la Fosfatasa ácida tartrato resistente, TRAcP 5b; EC 3.1.3.2) es una glicoproteína de 35-37 kDa. TRAP5b es típicamente expresada de manera proporcional a la actividad de los osteoclastos y es secretada a la circulación. Los estudios indican que TRAP5b en suero es potencialmente un marcador serológico útil para la resorción ósea.⁵

El kit MicroVue TRAP5b detecta la actividad enzimática de la TRAP5b basada en un sistema de enzimoimmunoensayo de captura.⁵

Se piensa que los valores elevados de TRAP5b en suero están asociados con un remodelamiento óseo activo. Se observan valores aumentados en suero durante el crecimiento óseo normal en niños sanos. Se han detectado también valores elevados en suero de TRAP5b en ciertos estados y condiciones de algunas enfermedades caracterizadas por una resorción ósea aumentada.^{1,14} Ejemplos de esto serían: La enfermedad ósea de Paget, hemodiálisis, hiperparatiroidismo primario, metastasis que impliquen resorción ósea, mieloma múltiple y mujeres con resorción bilateral de ovario. Las mujeres post-menopáusicas en terapia sustitutiva con estrógenos tienen típicamente valores en suero más bajos que las mujeres postmenopáusicas sin tratamiento; por lo tanto, la determinación específica de la actividad de TRAP5b podría ser un medio potencial de medición y monitorización de cambios en el metabolismo óseo como respuesta al tratamiento.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo MicroVue TRAP5b es un EIA de dos pasos, de captura directa, con 96 pocillos. Las muestras de suero o plasma así como los estándares y controles reconstituidos son añadidos a los pocillos de una microplaca recubierta junto con el diluyente de muestra.⁷⁻⁹

Los fragmentos inactivos de TRAP5b presentes en el suero de forma natural podrían interferir con la detección de TRAP5b en muestras fisiológicas. El ensayo MicroVue TRAP5b evita la influencia de fragmentos inactivos mediante la utilización de dos anticuerpos monoclonales diferentes. El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales únicos, el Trk49 y el Trk62, generados mediante inmunización realizada con TRAP5b purificada de células de hueso humano. El primer anticuerpo, Trk49, es altamente específico frente a los fragmentos inactivos de TRAP5b; el segundo anticuerpo, Trk62, es altamente específico para la TRAP5b intacta y activa. Trk49 se une a los fragmentos inactivos de TRAP5b, haciendo que el Trk62 esté más disponible para unirse a la molécula de TRAP5b activa en la microplaca. Esto da lugar a que el ensayo TRAP5b sea específico, tenga buena precisión y un amplio rango de linealidad.

Después de la incubación de la inmunoreacción, la placa es lavada para eliminar todo el material no unido y se añade el sustrato preparado, 2-cloro-4-nitrofenil fosfato (CNPP, pH 6,4), a los pocillos. Ya que TRAP5b es por sí mismo un enzima, no se requiere un conjugado anticuerpo-enzima secundario. Al final de esta incubación, la reacción es parada mediante la adición de una solución de NaOH 0,2 N y es leída en un lector

de microplacas a 405 nm. La actividad de TRAP5b es calculada mediante una curva cuadrática. La cantidad de color desarrollado es proporcional a la concentración de TRAP5b en las muestras.

REACTIVOS Y MATERIAL SUMINISTRADO

40 Ensayos de TRAP5b para ser realizados en duplicado (96 pocillos)

El kit MicroVue TRAP5b contiene lo siguiente:

A	TRAP5b Estándares	Items 0711631-71	0.4 mL, 2 cada uno
B	(Liofilizados) proteína recombinante integrada por TRAP5b Humano. La concentración exacta		
C	aparece reflejada en cada frasco		
D			
E			
L	Controles	Items 0711681-91	0.4 mL, 2 cada uno
H	(Liofilizados) proteína recombinante integrada por TRAP5b Humano. El rango de concentración aparece en el kit Certificado de Análisis (C de A)		
1	Microplaca	Item 0711611	12 cada uno
	12 x 8 pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal de ratón frente TRAP5b		
2	Solución de Parada	Item 07116C1	12 mL
	0,2N sodium hydroxide (NaOH)		
3	10X Solución de Lavado	Item 07116D1	100 mL
	TBS/Tween. Contiene 0,5% Tween® 20 y 0,02% ProClin® 300		
4	Diluyente de Muestra	Item 0711621	20 mL
	Tris buffer. Contiene 0,02% ProClin 300		
5	Solución de recons. de Sustrato	Item 07116B1	2 x 12 mL
	MES buffer. Contiene 0,02% ProClin 300		
6	Sustrato	Item 07116A1	2 x 12 mL
	Solución disolvente de Sustrato, 2-cloro-4-nitrofenil-fosfato en polvo (CNPP)		
	Cinta Cubierta de Microplaca	Item 0047	3 cada uno

Tween® 20 es una marca registrada de ICI Americas Inc.

ProClin® es una marca registrada de Rohm and Haas Company.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Micropipetas ajustables para la dispensación de 50, 100, 300 µL, mono y multicanal
- Agitador de microplaca capaz de agitación continua a 500-1000 rpm durante 60 minutos
- Incubadora a 37°C
- Probeta preparada para medición de líquidos de 10-300 mL
- Agua desionizada o destilada
- Lector de microplaca capaz de leer a 405 nm
- Ordenador con unidad de CD ROM
- Paquete de software que facilite la generación de datos, ajuste de curva cuadrática y análisis de datos
- Sistema adecuado para lavado de microplacas
- Pipeta graduada o equivalente para dispensar 12 mL
- Material absorbente para secar la microplaca en proceso después del lavado

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Trate las muestras como material potencialmente biopeligroso. Seguir las precauciones universales cuando se manejen los contenidos del este kit así como las muestras de pacientes.

- Utilizar los reactivos suministrados como unidad completa antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del embalaje.
- Almacenar los reactivos del ensayo como se indica.
- No utilizar las tiras recubiertas si la bolsa está perforada.
- Realizar el ensayo para cada muestra en duplicado.
- Llevar guantes y gafas de protección cuando se maneje este reactivo. Realizar buenas prácticas de laboratorio para reducir la exposición.
- 0,2N NaOH es tóxico y puede causar quemaduras graves. No ingerir. Evitar contacto con la piel, ojos y ropa. En caso de contacto, lavar con agua. En caso de ingestión, avisar a un médico.
- Evitar el contacto con la Solución de Sustrato irritante, la cual contiene cNPP. En caso de contacto accidental, lavar la piel inmediatamente a fondo con agua y jabón.
- ProClin 300 es utilizado como conservante. El contacto accidental o la ingestión de reactivos o soluciones que contengan ProClin pueden causar irritación en la piel, ojos o boca. Si aparecen síntomas, buscar asistencia médica.
- La utilización de pipetas multicanal o pipetas de repetición se recomienda para asegurar el tiempo de dispensación del reactivo.
- Para una medición exacta de las muestras, añadir de forma precisa las muestras y estándares. Pipetear de manera cuidadosa utilizando única-mente equipos calibrados.
- Realizar este ensayo con cualquier método de lavado validado. No lavar los pocillos con una pipeta multicanal.
- Generar una curva estándar con cada ensayo.
- Las concentraciones estándar son asignadas para cada lote. Leer las etiquetas de cada frasco de estándar o Certificado de Análisis cuidadosamente para ver las concentraciones específicas.
- La prueba debe realizarse en una zona que disponga de la ventilación adecuada.
- Deseche los envases y contenido no utilizado conforme a los requerimientos locales, estatales y federales reglamentarios.
- Vista preferentemente ropa protectora, guantes y protección para ojos/cara cuando esté manipulando los componentes del kit.
- Lavarse bien las manos después de manipular el kit.

ALMACENAMIENTO

Almacenar el kit a 2°C a 8°C. Almacenar los reactivos no utilizados a 2°C a 8°C. Bajo estas condiciones, los componentes del ensayo son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del kit.

RECOGIDA DE MUESTRA Y PREPARACIÓN

Suero o plasma (Heparina) pueden ser utilizados como muestra en el ensayo MicroVue TRAP5b. Recoger suero mediante técnica estándar de veno-punción, evitando la hemólisis. Permitir la retracción del coágulo y separar el suero por centrifugación.

Las muestras pueden ser almacenadas hasta 8 horas a temperatura ambiente, hasta 2 días a 2°C a 8°C, un mes a 20°C, y a -80°C para almacenamiento a largo plazo. Se recomienda no someter las muestras a más de tres ciclos de congelación/ descongelación.

PREPARACIÓN DE REATIVOS

Todos los reactivos deberían atemperarse a 18°C a 28°C antes de su uso.

Preparar los reactivos del ensayo de la siguiente manera:

Diluyente de Muestra

El diluyente de muestra se suministra listo para su uso.

Estándares

Añadir 400 µL de agua desionizada (destilada) a los frascos que contienen los estándares liofilizados y disolver durante al menos 5 minutos. Mezclar a fondo. Los estándares reconstituidos deberían ser utilizados en las 2 horas siguientes si se almacenan a 18°C a 28°C o en 24 horas si se almacenan a 4°C.

Controles

Añadir 400 µL de agua desionizada (destilada) a los frascos que contienen los controles liofilizados, y disolver durante al menos 5 minutos. Mezclar a fondo. Los controles reconstituidos deben ser utilizados en 2 horas si se almacenan a 18°C a 28°C o en 24 horas si se almacenan a 4°C.

10X Solución de Lavado

Diluir 100 mL de 10X Solución de Lavado con 900 mL de agua desionizada (destilada). La solución de lavado de trabajo es estable durante un mes a 18°C a 28°C.

Solución de Sustrato

Preparar la solución de sustrato de trabajo añadiendo el contenido de un vial de la Solución de Reconstitución de Sustrato. Preparar dentro de los 30 minutos de utilización.

Solución de Parada

La Solución de Parada se suministra lista para su uso.

ASSAY PROCEDURE

Leer el folleto del ensayo completamente antes de comenzar el ensayo.

Ver ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES y PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

Determine la cantidad necesaria de cada reactivo para el número de tiras que se vayan a utilizar.

Nº de tiras	4	6	8	12
Nº de muestras (analizadas por duplicado)	8	16	24	40
Sustrato (frasco)	1	1	1	1
Tampón de lavado 1X (mL)	100	150	200	300

Muestra/Incubación Enzimática

1. Permitir que las bolsitas de Tiras Recubiertas se atemperen a 18°C a 28°C antes de abrirlas. Retirar el marco de los soportes de las tiras y el número necesario de Tiras Recubiertas de la bolsita. Asegurarse que la bolsita que contiene las tiras sin usar sea cerrada y contiene desecante.
2. Pipetear 100 µL de Diluyente de Muestra en los pocillos de la microplaca.
3. Pipetear 50 µL de cada Estándar y Control reconstituidos al igual que la muestra en los pocillos apropiados.
4. Sellar la microplaca con la cinta cubierta de placas suministrada e incubar durante 60 minutos a 18°C a 28°C en un agitador de microplacas a 500 rpm a 1000 rpm.
5. Después de la incubación, lavar los pocillos de la microplaca tres veces con un mínimo de 300 µL de Solución de Lavado por pocillo. Después del lavado, sacudir cuidadosamente los pocillos sobre una toalla de papel para eliminar cualquier líquido que pueda quedar.

Incubación con Sustrato

6. Pipetear 100 µL de la Solución de Sustrato de trabajo en cada pocillo.
7. Sellar la microplaca y mezclar en un agitador de microplacas durante 30 segundos a 500 rpm a 1000 rpm. Después de la agitación, incubar durante 60 minutos en una incubadora a 37°C.

Parada/Lectura

- Pipetear 50 µL de la Solución de Parada en cada pocillo para parar la reacción.
- Leer y registrar la absorbencia de cada pocillo a 405 nm.
- Utilizar un ajuste de curva cuadrática para la curva estándar. Calcular los valores de los Controles y de las muestras a partir de la curva estándar.

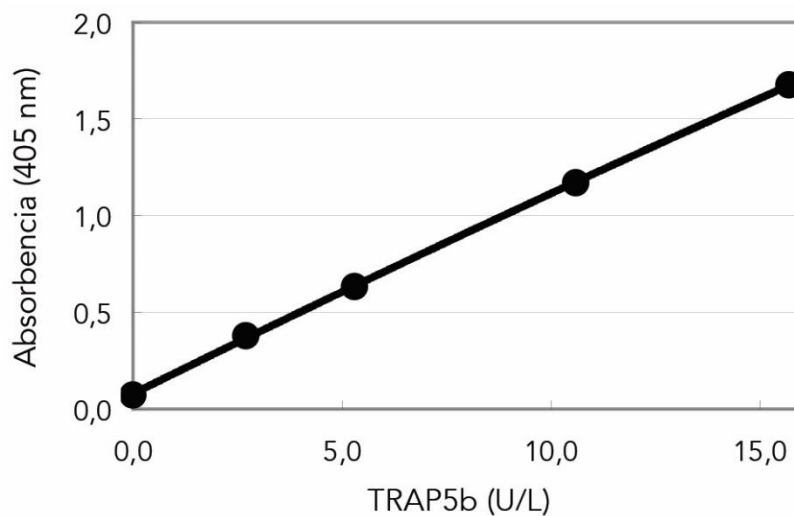
CONTROL DE CALIDAD

El Certificado de Análisis incluido en este kit es lote específico y es utilizado para verificar que los resultados obtenidos por su laboratorio son similares a los que han sido obtenidos por Quidel Corporation.

Se proporcionan también los rangos del control de calidad. Los valores de los controles tienen la función de verificar la validez de la curva y de los resultados de las muestras. Cada laboratorio debe establecer sus propios límites de aceptación de los parámetros del ensayo. Si los valores del control NO se encuentran dentro de los límites de aceptación de su laboratorio, los resultados del ensayo deberían considerarse cuestionables y las muestras deberían ser probadas nuevamente.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Curva Estándar Representativa



VALORES OBSERVADOS

Los valores séricos observados de la actividad de TRAP5b en hombres y mujeres sanos son los siguientes:

Sexo	Edad (años)	n	Media (U/L)
Hombres	≥ 20	91	4,0 ± 1,4
Mujeres (Premenopausia)	30 a 44	31	2,9 ± 1,4
Mujeres (Postmenopausia)	≥ 50	36	4,3 ± 1,5

Los valores observados de TRAP5b (U/L) en 64 adultos sanos (ver la información de género y edad) utilizando suero y plasma (Heparina). Las muestras de plasma fueron analizadas para compararlas con los resultados de suero.

- 28 hombres, edades 25 a 54 (media: 35,4)
- 36 mujeres, edades 21 a 59 (media: 41,9)

Tipo de muestra	Media (U/L)	Min	Max	Correlación (r)
Suero	3,5 ± 1,4	1,2	6,7	–
Plasma Heparina	3,6 ± 1,4	1,2	7,3	0,989

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

En esta sección se presentan los típicos datos analíticos del ensayo MicroVue TRAP5b. Para los valores de los estándares de la curva lote específicos y los valores del control ver el Certificado de Análisis.

Sensibilidad

El límite de detección mínimo del ensayo MicroVue TRAP5b es 0,2 U/L, determinado por el valor superior del límite de 3 SD en un estudio de precisión realizado con el estándar cero.

Precisión

■ Intra-ensayo (entre-prueba) (n = 16)

Muestra	Media (U/L)	Desviación Estándar (U/L)	%CV
1	3,4	0,07	2,2
2	7,4	0,14	1,9

■ Inter-ensayo (prueba-a-prueba) (n = 8)

Muestra	Media (U/L)	Desviación Estándar (U/L)	%CV
1	3,8	0,11	3,0
2	7,4	0,15	2,0

Recuperación

La recuperación del 92-103% fue determinada mediante la adición de una cantidad conocida de TRAP5b purificada a muestras de suero con diferentes niveles de TRAP5b endógena.

Linealidad

La linealidad se realiza mediante diluciones seriadas de suero con diluyente de muestras y comparando los valores observados con los esperados.

Muestra	Factor de dilución	Observado (U/L)	Esperado (U/L)	Recuperación (%)
1	Sin diluir	3,7	–	–
	1:2	1,8	1,8	95,9
	1:4	0,9	0,9	95,1
	1:8	0,5	0,5	101,2
2	Sin diluir	7,7	–	–
	1:2	3,8	3,8	99,8
	1:4	1,9	1,9	97,5
	1:8	0,9	1,0	97,4
3	Sin diluir	12,0	–	–
	1:2	5,8	6,0	96,2
	1:4	3,0	3,0	100,8
	1:8	1,4	1,5	95,9

Sustancias Inteferentes

Las siguientes sustancias fueron analizadas con las concentraciones especi-ficadas y no se encontraron interferencias con el ensayo:

Sustancia	Concentración
Hemoglobina	500 mg/dL
Bilirubina F	20 mg/dL
Bilirubina C	20 mg/dL
Lipidos (Intralipid®)	2500 Turbidez
RF (Factor Reumatoide)	500 U/mL

Intralipid® es una marca registrada de Fresenius Kabi AB.

ASISTENCIA

Para realizar un pedido o para recibir asistencia técnica, por favor contacte a su distribuidor local. Información adicional de Quidel, nuestros productos y nuestros distribuidores puede encontrarse en nuestra página www.quidel.com.

REFERENCIAS

- Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000, 15, 133-1345.
- Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, Woitge HW, Seibel MJ, Väänänen HK 2001 Serum Tartrate-resistant acid phosphatase is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem.* 47:597-600.
- Halleen JM 2003 Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption (Review). *Anticancer Res.* 23(2A):1027-1029.
- Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT 2001 Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem.* 47:74-80.
- Lamp EC, Drexler HG. Biology of tartrate-resistant acid phosphatase. *Leuk Lymphoma.* 2000, 39, 477-484.
- Leeming, et al 2006 The relative use of eight collagenous and noncollagenous markers for diagnosis of skeletal metastases in breast, prostate or lung cancer patients, *Cancer epidemiology Biomarkers.* 15(1).
- Igarashi Y, Mochizuki Y, Miura T, Ohashi T, Sasagawa K, Katayama K, Inaba N, Matsuzaki S. Evaluation of a novel immunoassay for serum tartrate-resistant acid phosphatase type 5b activity in hormone replacement therapy. *Bone* 2003; 32(5): S179.

8. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 1982, 34, 285-290.
9. Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, Singer FR, Baylink DJ. Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. *Clin Chem.* 1987, 33, 458-462.
10. Nakanishi M, Yoh K, Uchida K, Maruo S, Matsuoka A. Improved method for measuring tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin Chem.* 1998, 44, 221-225.
11. Nakanishi M, Yoh K, Miura T, Ohasi T, Rai SK, Uchida K. Development of a kinetic assay for band 5b tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum. *Clin Chem.* 2000, 46, 469-473.
12. Waguespack SG, Hui SL, White KE, Buckwalter KA, Econs MJ. Measurement of tartrate-resistant acid phosphatase and the brain isoenzyme of creatine kinase accurately diagnose type II autosomal dominant osteopetrosis but does not identify gene carriers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87, 2212-2217.
13. Igarashi Y, Lee M, Matsuzaki S. Acid phosphatases as markers of bone metabolism. *J Chromatogr B.* 2002, 781, 345-358.
14. Terpos E, de la Fuente J, Szydlo R, Hatjiharissi E, Viniou N, Meletis J, Yataganas X, Goldman JM, Rahemtulla A. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b: a novel serum marker for monitoring bone disease in multiple myeloma. *Int J Cancer.* 2003, 106, 455-457

REF 8036 – MicroVue TRAP5b EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PI8036000ES00 (02/17)

GLOSARIO

REF

Número del catálogo



Marca CE de conformidad

EC REP

Representante autorizado en la Comunidad Europea

LOT

Código de lote



Fecha de caducidad



Fabricante



Limites de temperatura



Indicaciones



Consulte los instrucciones e-etiquetado de uso



Riesgo biológico

IVD

Para uso diagnóstico *in vitro*



Contiene una cantidad suficiente para 96 determinaciones

CONT

Contenido / Contiene

CONTROL

Control
