



QUIDEL

MicroVue™ Bone

TRAP5b EIA

Dosage immunoenzymatique de l'isoforme 5b de la phosphatase acide tartrate-résistante dans le sérum ou le plasma humain

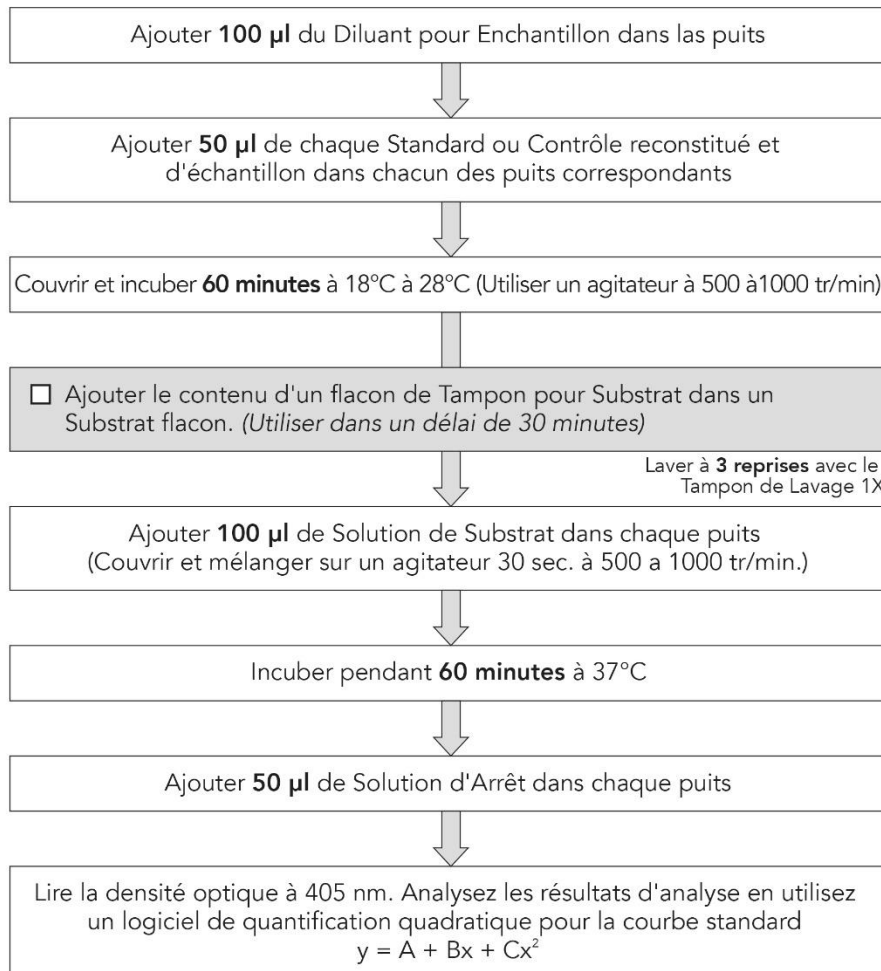
À des fins de diagnostic *in vitro* uniquement. Réservé à l'export. Non destiné à la vente aux États-Unis ou au Canada.

RÉSUMÉ

Préparation de réactif

- Reconstituer chaque Standard avec 400 µl d'eau désionisée (distillée).
(Utilisez au cours de 2 heures)
- Reconstituer chaque Contrôle avec 400 µl d'eau désionisée (distillée).
(Utilisez au cours de 2 heures)
- Diluer le Tampon de Lavage 10X 1:10 avec d'eau désionisée (distillée).
REMARQUE: Mélanger doucement avec la pipette; Ne faites pas de tourbillon.

Procédure de l'essai





INTÉRÊT CLINIQUE

Le dosage MicroVue TRAP5b permet de détecter l'isoforme 5b de la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAcP 5b) grâce à un dosage immunoenzymatique. La TRAP5b est sécrétée dans le sérum par les ostéoclastes osseux et est donc un indicateur de leur activité *in vivo*. Les taux de TRAP5b traduisent l'activité ostéoclastique et donc la résorption osseuse dans l'ostéoporose primaire et dans d'autres pathologies.¹⁻⁶

CARACTÉRISTIQUES

- Durée totale du dosage: 2 heures.
- La trousse ne mesure que l'activité de la forme active de la TRAP5b.
- Pas de prédilution des échantillons.

RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

TRAP5b (isoforme 5b de la phosphatase acide tartrate-résistante sérique, TRAcP 5b; EC 3.1.3.2) est une glycoprotéine de 35-37 kDa. La TRAP5b est exprimée en fonction de l'activité des ostéoclastes et libérée dans la circulation. On a montré que la TRAP5b sérique est un marqueur sérique potentiel de la résorption osseuse.⁵

La trousse MicroVue TRAP5b permet de détecter l'activité enzymatique de la TRAP5b grâce à un dosage immunoenzymatique.⁵

On associe des taux élevés de TRAP5b à une activité intense du remodelage osseux. Une augmentation des taux sériques s'observe pendant la croissance normale des os chez les enfants en bonne santé. On a également observé une élévation des taux de TRAP5b dans certains états pathologiques caractérisés par une augmentation de la résorption osseuse,^{1,14} comme la maladie de Paget, l'hémodialyse, l'hyperparathyroïdisme primaire, les métastases impliquant une résorption osseuse, les myélomes multiples ou encore chez des femmes qui ont subi une ovariectomie bilatérale. Les femmes post-ménopausées sous THS ont en particulier des taux sériques plus faibles que les femmes post-ménopausées non traitées; c'est pourquoi, le dosage spécifique de l'activité de la TRAP5b peut se révéler utile dans l'évaluation et le suivi des modifications du métabolisme osseux sous l'effet du traitement.

PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage MicroVue TRAP5b est un dosage EIA de 96 puits en 2 étapes, par capture directe. Les échantillons de sérum ou de plasma sont ajoutés, ainsi que les standards et les contrôles reconstitués, dans les puits coatés de la microplaque ainsi que le diluant pour échantillon.⁷⁻⁹

Des fragments inactifs de TRAP5b, présents naturellement dans le sérum, peuvent interférer avec la détection de la TRAP5b dans les échantillons physiologiques. Le dosage MicroVue TRAP5b échappe à l'influence de ces fragments inactifs grâce à l'utilisation de deux anticorps monoclonaux différents. Le dosage utilise deux anticorps monoclonaux uniques, Trk49 et Trk62, obtenus par immunisation à l'aide de TRAP5b purifiée à partir de cellules osseuses humaines. Le premier anticorps, Trk49, est hautement spécifique des fragments inactifs de TRAP5b; le second, Trk62, est hautement spécifique de la TRAP5b intacte active. Trk49 se lie aux fragments inactifs de TRAP5b, ce qui permet à Trk62 d'être disponible pour fixer la TRAP5b active dans le puits. Le dosage de TRAP5b ainsi obtenu est spécifique et possède à la fois une bonne précision et une bonne linéarité.

Après la réaction immunologique, la plaque est lavée, afin d'éliminer le matériel non lié, et une solution de substrat, le 2-chloro-4-nitrophenyl phosphate (cNPP, pH 6,4), est ajoutée dans les puits. Puisque la TRAP5b est elle-même une enzyme, il n'est pas nécessaire d'ajouter un conjugué enzyme-deuxième anticorps marqué. A la fin de l'incubation, on stoppe la réaction à l'aide d'une solution de NaOH 0,2N, et la lecture se

fait sur un lecteur de microplaques à 405 nm. On calcule l'activité de la TRAP5b à partir d'une courbe standard à quatre paramètres. L'intensité de la couleur développée est proportionnelle à la concentration de la TRAP5b présente dans l'échantillon.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL FOURNIS

40 dosages de TRAP5b en duplicate (96 puits)

La trousse de MicroVue TRAP5b contient les éléments suivants:

A	TRAP5b Standards	Réf: 0711631-71	2 x 0,4 ml chacun
B	La protéine de recombinant a composé d'Humain TRAP5b. (lyophilisée). La concentration exacte		
C	figure sur chaque flacon.		
D			
E			
L	Contrôles	Réf: 0711681-91	2 x 0,4 ml chacun
H	La protéine de recombinant a composé d'Humain TRAP5b. (lyophilisée). Les fourchettes de concentrations figurent sur le Certificat d'Analyse.		
1	Barettes de puits	Réf: 0711611	12 chacun
	12 x 8 puits coatés par des anticorps monoclonaux murins anti-TRAP5b		
2	Solution d'Arrêt	Réf: 07116C1	12 ml
	0,2N hydroxide de sodium (NaOH)		
3	Tampon de Lavage concentré 10X	Réf: 07116D1	100 ml
	TBS/Tween. Contient 0,5% Tween® 20 et 0,02% ProClin® 300		
4	Diluant pour Echantillon	Réf: 0711621	20 ml
	Tampon Tris. Contient 0,02% ProClin 300		
5	Tampon pour Substrat	Réf: 07116B1	2 x 12 ml
	Tampon MES. Contient 0,02% ProClin 300		
6	Substrat	Réf: 07116A1	2 x 12 ml
	Substrat lyophilisé, 2-chloro-4-nitrophenyl-phosphate (cNPP)		
	Couvercles de Plaque	Réf: 0047	3 chacun

Tween® 20 est une marque déposée de ICI Americas Inc.
ProClin® est une marque déposée de Rohm and Haas Company.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Micropipettes ou multipettes de précision pour distribuer 50, 100 et 300 µL
- Agitateur de microplaques capable de maintenir 500-1000 tr/min pendant 60 minutes
- L'incubateur à 37°C à
- Récipients pouvant mesurer 10-300 ml
- Eau désionisée ou distillée
- Lecteur de plaques pouvant lire à 405 nm
- Ordinateur avec lecteur de CD ROM
- Logiciel de gestion de courbe standard à quatre paramètres
- Equipement de lavage de microplaque
- Pipette graduée pour distribuer 12 ml
- Papier absorbant pour égoutter la microplaque après lavage

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- À des fins de diagnostic *in vitro*.

- Traiter tous les échantillons comme des produits potentiellement dangereux. Suivre les précautions standard lors de la manipulation de cette trousse et des échantillons de patients.
- Utiliser ensemble tous les réactifs avant la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte.
- Suivre les recommandations pour la conservation des réactifs.
- Ne pas utiliser les barettes de puits, si leur emballage est abîmé.
- Doser chaque échantillon en duplicate.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette trousse.
- NaOH 0,2N est un produit irritant et peut entraîner une irritation des surfaces exposées. Ne pas ingérer. Éviter tout contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. En cas de contact, laver à grande eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
- Éviter tout contact avec la Solution de Substrat irritante, qui contient du cNPP. En cas de contact accidentel, laver aussitôt abondamment à l'eau et au savon.
- Le ProClin 300 est un conservateur. Tout contact ou ingestion accidentels de tampons ou de réactifs contenant du ProClin peut entraîner une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. Appeler un médecin si on observe ces symptômes.
- Utiliser des multipettes ou des pipetteurs automatiques afin de limiter le temps de distribution des réactifs.
- Pour obtenir une mesure précise des échantillons, pipeter avec précaution les échantillons et les standards en utilisant du matériel calibré.
- Utiliser pour le lavage une méthode validée. Ne pas laver les puits à l'aide d'une multipette.
- Inclure une courbe standard dans chaque série de dosages.
- Les concentrations de Standards sont propres à chaque lot de réactifs. Elles sont indiquées sur les étiquettes des flacons ou sur le Certificat d'Analyse.
- Le test doit être effectué dans une zone suffisamment ventilée.
- Éliminer les contenants et les contenus non utilisés conformément aux exigences fédérales, nationales et réglementations réglementaires locales.
- Porter des gants et des lunettes de protection, et suivre les bonnes pratiques de laboratoire en manipulant cette trousse.
- Lavez-vous soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, veuillez vous référer à la Fiche de données de sécurité (FDS) que vous trouverez sur quidel.com.

CONSERVATION

Conserver la trousse à 2°C à 8°C. Conserver les réactifs non utilisés à 2°C à 8°C. Dans ces conditions, les composants du dosage sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la trousse.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

On peut utiliser du sérum ou du plasma (sur héparine) dans le dosage MicroVue TRAP5b. Prélever le sérum à l'aide d'une technique de ponction veineuse en évitant l'hémolyse. Laisser le sang coaguler, et séparer le sérum par centrifugation.

On peut conserver les échantillons 8 heures à température ambiante, 2 jours à 2°C à 8°C, un mois à -20°C, ou bien à -80°C pour une conservation plus longue. Ne pas congeler/décongeler à plus de 3 reprises.

PRÉPARATION ET CONSERVATION DES RÉACTIFS

Amener tous les réactifs à température ambiante (18°C à 28°C) avant usage.

Préparer les réactifs de la façon suivante:

Diluant pour Echantillon

Le Diluant pour Echantillon est prêt à l'emploi.

Standards

Ajouter 400 µL d'eau désionisée (distillée) dans chaque flacon de Standard, attendre au moins 5 minutes. Bien mélanger. Les Standards reconstitués sont stables 2 heures à température ambiante (18°C à 28°C) ou 24 heures à 4°C.

Contrôles

Ajouter 400 µL d'eau désionisée ou (distillée) dans chaque flacon contenant les Contrôles lyophilisés et attendre au moins 5 minutes. Bien mélanger. Les Contrôles sont stables 2 heures à température ambiante (18°C à 28°C) ou 24 heures à 4°C.

Tampon de Lavage 10X

Diluer 100 ml du Tampon de Lavage 10X à l'aide de 900 ml d'eau désionisée (distillée). La solution de travail de Tampon de Lavage est stable 1 mois à 18°C à 28°C.

Solution de Substrat

Préparer la Solution de Substrat de travail en ajoutant le contenu d'un flacon de Tampon pour Substrat d'un Substrat flacon. Utiliser dans un délai de 30 minutes.

Solution d'Arrêt

La Solution d'Arrêt est prête à l'emploi.

DOSAGE

Lire le protocole en entier avant de commencer le dosage.

Voir les paragraphes AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS et PRÉPARATION DES RÉACTIFS.

Déterminer la quantité de chaque réactif nécessaire pour le nombre de plaques à utiliser.

Quantité de plaques	4	6	8	12
Quantité d'échantillons (testés en double)	8	16	24	40
Substrat (flacon)	1	1	1	1
Tampon de lavage 1X (mL)	100	150	200	300

Incubation Echantillon / Enzyme

1. Amener la pochette contenant les barettes de puits coatés à température ambiante 18°C à 28°C avant de l'ouvrir. Prendre dans la pochette le support et le nombre de barettes de puits coatés nécessaires au dosage, puis refermer avec soin la pochette contenant le reste des barettes et le dessiccateur.
2. Pipeter 100 µL de Diluant pour Echantillon dans les puits de la microplaque.
3. Pipeter 50 µL de chaque Standard ou Contrôle reconstitué et d'échantillon dans chacun des puits correspondants.
4. Couvrir la plaque à l'aide du couvercle fourni et incubé 60 minutes à 18°C à 28°C sur un agitateur de microplaques à 500 à 1000 tr/min.
5. Après incubation, laver les puits à 3 reprises avec un minimum de 300 µL de Tampon de Lavage par puits. Après le lavage, égoutter doucement les puits sur du papier absorbant, pour éliminer le reste du liquide.

Incubation du Substrat

6. Pipeter 100 µL de Solution de Substrat de travail dans chaque puits.

- Couvrir la microplaque et mélanger sur un agitateur de microplaques pendant 30 secondes à 500 à 1000 tr/min. Après agitation, incuber pendant 60 minutes à 37°C dans un incubateur.

Arrêt/Lecture

- Pipeter 50 µL de Solution d'Arrêt dans chaque puits, afin de stopper la réaction.
- Lire la densité optique de chaque puits à 405 nm.
- Utiliser un logiciel de quantification quadratique pour la courbe standard. Calculer les valeurs des Contrôles et des échantillons à partir de la courbe standard.

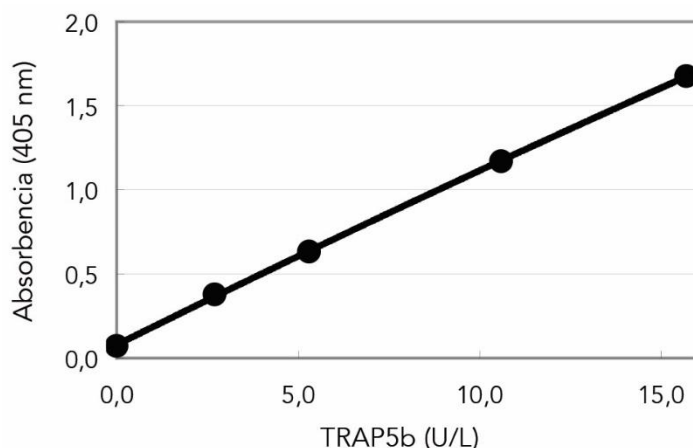
CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le Certificat d'Analyse inclus dans la trousse est spécifique du lot, et permet de vérifier que les résultats obtenus dans votre laboratoire sont semblables à ceux obtenus par Quidel.

Des fourchettes de valeurs sont fournies pour les contrôles. Les valeurs de ces derniers servent à vérifier la validité de la courbe standard et des résultats obtenus pour les échantillons. Chaque laboratoire devrait établir ses propres critères d'acceptation. Si les valeurs des contrôles NE sont PAS dans les limites acceptables, il est préférable de refaire le dosage des échantillons.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Exemple de Courbe Standard



VALEURS OBSERVÉES

Les valeurs observées pour l'activité de la TRAP5b chez des hommes et des femmes en bonne santé sont les suivantes:

Sexe	Age (ans)	n	Moyenne (U/l)
Hommes	≥ 20	91	4,0 ± 1,4
Femmes (Pré-ménopausées)	30 à 44	31	2,9 ± 1,4
Femmes (Post-ménopausées)	≥ 50	36	4,3 ± 1,5

On a observé les valeurs suivantes de TRAP5b (U/l) chez 64 adultes sains (voir le détail des âges et sexes ci-dessous) en utilisant à la fois du sérum et du plasma (Héparine). On a comparé les résultats obtenus pour les plasmas et les sérums.

- 28 Hommes, âgés de 25 à 54 ans (moyenne: 35,4)

- 36 Femmes, âgées de 21 à 59 ans (moyenne: 41,9)

Echantillon	Moy. (U/l)	Min	Max	Corrélation (r)
Sérum	3,5 ± 1,4	1,2	6,7	–
Plasma hépariné	3,6 ± 1,4	1,2	7,3	0,989

CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

On trouvera ci-dessous des exemples de résultats obtenus avec la trousse MicroVue TRAP5b. Pour chaque lot, se reporter à la courbe standard et aux valeurs de contrôle mentionnées dans le Certificat d'Analyse.

Sensibilité

La limite de détection du dosage MicroVue TRAP5b est égale à 0,2 U/l, calculée comme la limite supérieure obtenue pour 3 DS dans une étude de précision réalisée à l'aide du standard zéro.

Précision

- Intra-essai (n = 16)

Echantillon	Moyenne (U/l)	Déviations Standard (U/l)	%CV
1	3,4	0,07	2,2
2	7,4	0,14	1,9

- Inter-essais (n = 8)

Echantillon	Moyenne (U/l)	Déviations Standard (U/l)	%CV
1	3,8	0,11	3,0
2	7,4	0,15	2,0

Surcharge

Le taux de récupération varie entre 92 et 103% et a été calculé en ajoutant une quantité connue de TRAP5b purifiée à des échantillons de sérums possédant des taux différents de TRAP5b endogène.

Linéarité

On a évalué la linéarité en diluant en cascade des sérums à l'aide du Diluant pour Echantillon, et en comparant les valeurs obtenues aux valeurs attendues.

Echantillon	Facteur Dilution	Observée (U/l)	Attendue (U/l)	Récupération (%)
1	pur	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	pur	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	pur	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

Substances Interférantes

On n'a pas observé d'interférences pour les substances suivantes, testées selon les concentrations indiquées.

Substance	Concentration
Hémoglobine	500 mg/dl
Bilirubine F	20 mg/dl
Bilirubine C	20 mg/dl
Lipides (Intralipid®)	2500 Turbidité
FR (Facteur Rhumatoïde)	500 U/ml

Intralipid® is a registered trademark of Fresenius Kabi AB.

ASSISTANCE

Pour une commande ou une question technique, veuillez contacter votre distributeur local.

Vous trouverez des informations sur Quidel, ses produits et ses distributeurs sur le site quidel.com.

RÉFÉRENCES

1. 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.
2. 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.
3. Halleen JM 2003 Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption (Review). *Anticancer Res.* 23(2A):1027-1029.
4. 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.
5. Lamp EC, Drexler HG. Biology of tartrate-resistant acid phosphatase. *Leuk Lymphoma.* 2000, 39, 477-484.
6. 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).
7. 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

PI8036000FR00 (02/17)

GLOSSAIRE

REF

Référence catalogue



Conformité Européenne

EC REP

Représentant autorisé dans
la Communauté Européenne

LOT

Référence du lot



Date d'expiration



Fabricant



Conditions de stockage



Utilisation prévue



Consulter les instructions
électroniques



Risques biologiques

IVD

Pour utilisation *in vitro*



Contenu suffisant pour 96 déterminations

CONT

Contenu

CONTROL

Contrôle
