

**Saggio immunoenzimatico a cattura per la determinazione della fosfatasi acida, tarttrato resistente isoforma 5b nel siero o nel plasma umano**

Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per esportazione. Non destinato alla vendita o all'uso negli Stati Uniti o in Canada.

## SOMMARIO

### Preparato di il Campione ed il reagente

- Reidrati ogni Standard con 400 µL acqua deionizzata. (Uso entro 2 ore)
- Reidrati ogni Controlli con 400 µL acqua deionizzata. (Uso entro 2 ore)
- Diluire la Soluzione di Lavaggio 10X 1:10 con acqua deionizzata.

**NOTA: miscela delicatamente con pipetta; non il vortice.**

### Procedura del Saggio

Pipettare **100 µL** di diluente per campioni nei pozzetti per micropiastre

Pipettare **50 µL** di ciascun standard ricostituito, controllo e campione nei pozzetti per micropiastre corrispondenti

Incubare per **60 minuti** a 18°C a 28°C  
(Usare un agitatore 500 rpm a 1000 rpm)

- Aggiungere il contenuto di un flacone di Tampone Ricostituzione Substrato a un Substrato flaconcino. (Preparare entro 30 minuti dall'uso)

Lavare **3X** con la Solution de Lavage 1X

Pipettare a ciascun pozzetto **100 µl** di soluzione attiva di substrato  
(Agitare per 30 sec. a 500 rpm a 1000 rpm)

Incubare per **60 minuti** a 37°C

Pipettare **50 µL** di soluzione bloccante in ciascun pozzetto

Leggere densità ottica a 405 nm. Analizzi i risultati di analisi usando una misura quadratica della curva  
 $y = A + Bx + Cx^2$



## FINALITÀ D'USO

MicroVue TRAP5b è un saggio immunoenzimatico a cattura per la determinazione della fosfatasi acida, tartrato resistente isoforma 5b (TRAcP 5b). La TRAP5b viene secreta nel siero attraverso gli osteoclasti di ricostituzione dell'osso ed è un indicatore di attività osteoclastica *in vivo*. I livelli di attività della TRAP5b possono essere utili indicatori dell'attività osteoclastica e quindi del riassorbimento osseo nell'osteoporosi primaria e in altre patologie.<sup>1-6</sup>

## CARATTERISTICHE

- La durata totale del saggio è di due ore.
- Il kit misura solo l'attività enzimatica della TRAP5b attiva.
- I campioni non richiedono pre-diluizione.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La TRAP5b (fosfatasi acida resistente al tartrato, band 5 nel siero, TRAcP 5b; EC 3.1.3.2) è una glicoproteina 35-37 kDa. La TRAP5b viene generalmente espressa in proporzione all'attività osteoclastica e viene secreta nella circolazione. Le ricerche mostrano che la TRAP5b del siero è un marcatore sierologico potenzialmente utile per il riassorbimento osseo.<sup>5</sup>

Il kit del saggio MicroVue TRAP5b rileva l'attività enzimatica della TRAP5b in base ad un sistema di saggio immunoenzimatico a cattura.<sup>5</sup>

Livelli elevati di TRAP5b nel siero vengono associati ad una rimodellazione ossea attiva. Maggiori livelli nel siero sono stati osservati durante la normale crescita ossea in bambini sani. Livelli elevati di TRAP5b nel siero sono stati rilevati anche in alcuni stati e condizioni patologiche caratterizzate da un maggiore riassorbimento osseo.<sup>1,14</sup> Esempi: Il morbo di Paget alle ossa, emodialisi, iperparatiroidismo primario, patologie maligne metastatiche comprendenti il riassorbimento osseo, mieloma multiplo e donne sottoposte a ovariectomia bilaterale. Generalmente le donne in post-menopausa sottoposte a terapia sostitutiva degli estrogeni presentano livelli inferiori nel siero rispetto a donne in postmenopausa non sottoposte a trattamento, la determinazione specifica dell'attività della TRAP5b può essere un potenziale mezzo per la misurazione e il controllo delle variazioni nel metabolismo osseo in risposta alla terapia.

## PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il saggio MicroVue TRAP5b è un saggio immunoenzimatico a due fasi, a cattura diretta, a 96 pozzetti. I campioni di siero o di plasma e gli standard e i controlli ricostituiti vengono aggiunti nei pozzetti rivestiti delle piastre per micropozzetti, insieme al diluente per campioni.<sup>7-9</sup>

I frammenti di TRAP5b inattivi presenti normalmente nel siero possono interferire con il rilevamento della TRAP5b nei campioni fisiologici. Il saggio MicroVue TRAP5b impedisce l'influenza dei frammenti inattivi usando due diversi anticorpi monoclonali. Il saggio utilizza due anticorpi monoclonali unici, Trk49 e Trk62, generati tramite immunizzazione della TRAP5b purificata dalle cellule ossee umane. Il primo anticorpo, Trk49, è altamente specifico ai frammenti di TRAP5b inattivi; il secondo anticorpo, Trk62, è altamente specifico per la TRAP5b attiva e intatta. Trk49 lega i frammenti di TRAP5b inattivi, rendendo così Trk62 più disponibile a legare la TRAP5b attiva nel micropozzetto. Il saggio TRAP5b risultante è specifico, ha una buona precisione ed un'ampia linearità.

Dopo l'incubazione per immunoreazione, la piastra viene lavata al fine di rimuovere il materiale non legato e nei pozzetti viene aggiunto un substrato preparato di 2-cloro-4-fosfato di nitrofenile (CNPP, pH 6,4). Poiché anche l'analita della TRAP5b è un enzima, non è necessario un coniugato anticorpo-enzima secondario marcato. Al termine dell'incubazione, la reazione viene interrotta con l'aggiunta di una soluzione 0,2N NaOH e letta tramite lettore per micropiastra a 405 nm. L'attività della TRAP5b viene quindi

calcolata da una curva quadratica. La quantità di colore sviluppata è proporzionale alla concentrazione di TRAP5b nei campioni.

## REAGENTI E MATERIALI FORNITI

**40 saggi per TRAP5b condotti in duplicato (96 pozzetti)**

**Il kit per saggio MicroVue TRAP5b contiene i seguenti materiali e reagenti:**

<b>A</b>	<b>Standard TRAP5b</b>	<b>Art. 0711631-71</b>	<b>2 x 0,4 mL cad.</b>
<b>B</b>	proteina ricombinante è composto da TRAP5b umana (liofilizzata). La concentrazione esatta è indicata		
<b>C</b>	su ciascuna fiala.		
<b>D</b>			
<b>E</b>			
<b>L</b>	<b>Controlli</b>	<b>Art. 0711681-91</b>	<b>2 x 0,4 mL cad.</b>
<b>H</b>	proteina ricombinante è composto da TRAP5b umana (liofilizzata). L'intervallo di concentrazione è indicato sul Certificato di analisi del kit (C di A).		
<b>1</b>	<b>Piastra per micropozzetto</b>	<b>Art. 0711611</b>	<b>12 pezzi</b>
	12 x 8 pozzetti rivestiti con anticorpi anti-TRAP5b monoclonali murini		
<b>2</b>	<b>Soluzione bloccante</b>	<b>Art. 07116C1</b>	<b>12 mL</b>
	0,2N idrossido di sodio (NaOH)		
<b>3</b>	<b>Tampone di lavaggio 10X</b>	<b>Art. 07116D1</b>	<b>100 mL</b>
	TBS/Tween. Contiene 0,5% di Tween® 20 e 0,02% di ProClin® 300		
<b>4</b>	<b>Diluente per campioni</b>	<b>Art. 0711621</b>	<b>20 mL</b>
	Tampone Tris. Contiene lo 0,02% di ProClin 300		
<b>5</b>	<b>Tampone ricostituzione substrato</b>	<b>Art. 07116B1</b>	<b>2 x 12 mL</b>
	Tampone MES. Contiene lo 0,02% di ProClin 300		
<b>6</b>	<b>Substrato</b>	<b>Art. 07116A1</b>	<b>2 x 12 mL</b>
	Soluzione di dissolvimento substrato, 2-cloro-4-fosfato di nitrofenile polvere (CNPP)		
	<b>Nastro copri piastra</b>	<b>Art. 0047</b>	<b>3 pezzi</b>

Tween® 20 è un marchio registrato di ICI Americas Inc.

ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.

## MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Micropipette regolabili per la dispensazione di 50, 100, 300 µL, mono o multi-canale
- Agitatore per micropiastra in grado di agitare costantemente a 500-1000 giri/min. per 60 minuti
- Incubatore a 37°C
- Materiale da laboratorio adatto per la misurazione di liquidi da 10-300 mL
- Acqua deionizzata o distillata
- Lettore per micropiastra in grado leggere a 405 nm
- Computer con unità CD ROM
- Pacchetto software per la generazione di dati, adattamento curva quadratica e analisi dati
- Adeguato dispositivo per lavaggio delle micropiastre
- Pipetta graduata o equivalente per la dispensazione di 12 mL
- Materiale assorbente per asciugare le micropiastre in lavorazione dopo il lavaggio

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Trattare i campioni come materiale a potenziale rischio biologico. Seguire le precauzioni generali durante la manipolazione del contenuto di questo kit e di qualunque campione paziente.

- Usare i reagenti forniti come un'unità integrale prima della data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.
- Conservare i reagenti del saggio come indicato.
- Non usare le strisce rivestite se la busta protettiva è danneggiata.
- Sottoporre a test ciascun campione in duplicato.
- Durante la manipolazione del contenuto del kit, indossare guanti e occhiali protettivi. Adottare una buona pratica di laboratorio per ridurre l'esposizione.
- 0,2N NaOH è irritante e può provocare irritazione nelle aree esposte. Non ingerirlo. Evitare il contatto con la cute, gli occhi o gli indumenti. Se avviene il contatto, lavare con acqua. Se ingerito, consultare un medico.
- Evitare il contatto con la soluzione per substrato irritante, contenente CNPP. In caso di contatto accidentale, lavare immediatamente la cute con acqua e sapone.
- Come conservante viene utilizzato ProClin 300. Il contatto o l'ingestione accidentale di tamponi o reagenti contenenti ProClin può causare irritazioni alla cute, agli occhi o alla bocca. In presenza di sintomi, consultare un medico.
- Si consiglia l'uso di pipette multicanale o di pipettatori a ripetizione per garantire la fornitura veloce dei reagenti.
- Per una misurazione accurata dei campioni, aggiungere accuratamente i campioni e gli standard. Pipettare attentamente, usando esclusivamente apparecchiature calibrate.
- Questo saggio può essere eseguito con qualunque metodo di lavaggio convalidato. Non lavare i pozzetti con una pipetta multicanale
- Generare una curva standard con ogni saggio.
- Per ciascun lotto viene assegnata una concentrazione standard. Per informazioni sulle concentrazioni specifiche, leggere l'etichetta su ciascuna fiala di standard o sul certificato di analisi.
- I test devono essere effettuati in un'area dotata di ventilazione adeguata.
- Smaltire i contenitori e il contenuto inutilizzato in conformità con la normativa nazionale e locale in vigore.
- Indossare indumenti protettivi, guanti, e protezione occhio/viso durante l'utilizzo del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile su [quidel.com](http://quidel.com).

## CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2°C a 8°C. Conservare i reagenti a 2°C a 8°C. In determinate condizioni, i componenti del saggio sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del kit.

## PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il siero o il plasma (eparina) possono essere usati come campioni nel saggio MicroVue TRAP5b. Prelevare il siero adottando una tecnica di venopuntura standard, evitando l'emolisi. Lasciare che il sangue coaguli e separare il siero tramite centrifugazione.

I campioni possono essere conservati fino a 8 ore a temperatura ambiente, fino a 2 giorni a 2°C a 8°C, un mese a -20°C e -80°C per conservazione a lungo termine. Non sottoporre i campioni a più di 3 cicli di congelamento/ decongelamento.

## PREPARAZIONE DEL REAGENTE

**Prima dell'uso, lasciare equilibrare tutti i reagenti a 18°C a 28°C.**

Di seguito è descritta la preparazione dei reagenti del dosaggio:

### Diluyente per campioni

Il diluyente per campioni viene fornito pronto all'uso.

## Standard

Aggiungere 400 µL di acqua deionizzata (distillata) nella fiala contenente standard liofilizzato e lasciare dissolvere per almeno 5 minuti. Miscelare completamente. Gli standard ricostituiti devono essere usati entro 2 ore se conservati a 18°C a 28°C o entro 24 ore se conservati a 4°C.

## Controlli

Aggiungere 400 µL di acqua deionizzata (distillata) nelle fiale contenenti controlli liofilizzati e lasciare dissolvere per almeno 5 minuti. Miscelare completamente. I controlli ricostituiti devono essere usati entro 2 ore se conservati a 18°C a 28°C o entro 24 ore se conservati a 4°C.

## Tampone di lavaggio 10X

Diluire 100 mL di tampone di lavaggio 10X con 900 mL di acqua deionizzata (distillata). Il tampone di lavaggio attivo è stabile per 1 mese a 18°C a 28°C.

## Soluzione per substrato

Preparare la soluzione per substrato attiva aggiungendo il contenuto di un flacone di Tampone di Ricostituzione Substrato a un Substrato flaconcino. Preparare entro 30 minuti dall'uso.

## Soluzione bloccante

La soluzione bloccante viene fornita pronta all'uso.

## PROCEDURA DEL SAGGIO

**Prima di iniziare il saggio, leggere completamente l'insero fornito con il prodotto.**

*Fare riferimento alle sezioni AVVERTENZE E PRECAUZIONI e PREPARAZIONE DEL REAGENTE.*

Determinare la quantità necessaria di ciascun reagente per il numero di strisce da usare.

# di strisce	4	6	8	12
# di campioni (sottoposti a test in duplicato)	8	16	24	40
Substrato (flacone)	1	1	1	1
Tampone di lavaggio 1X (mL)	100	150	200	300

## Incubazione del campione/enzima

1. Prima dell'apertura, lasciare equilibrare a 18°C a 28°C la busta protettiva contenente le strisce rivestite. Rimuovere il telaio Stripwell dalla busta protettiva e il numero necessario di strisce rivestite. Verificare che la busta protettiva con le strisce inutilizzate venga risigillata completamente e che contenga l'essiccante.
2. Pipettare 100 µL di diluente per campioni nei pozzetti per micropiastre.
3. Pipettare 50 µL di ciascun standard ricostituito, controllo e campione nei pozzetti per micropiastre corrispondenti.
4. Sigillare la piastra per micropozzetto con il nastro copri piastra fornito e incubare per 60 minuti a 18°C a 28°C su un agitatore per micropiastra a 500 rpm a 1000 rpm.
5. Al termine dell'incubazione, lavare i pozzetti per micropiastra tre volte con almeno 300 µL di tampone di lavaggio per pozzetto. Al termine del lavaggio, picchiare delicatamente i pozzetti sulla carta assorbente per eliminare eventuali residui di liquido.

## Incubazione del substrato

6. Pipettare a ciascun pozzetto 100 µL di soluzione attiva di substrato.
7. Sigillare la micropiastra e miscelare su un agitatore per micropiastra per 30 secondi a 500 rpm a 1000 rpm. Dopo avere agitato, incubare per 60 minuti in un incubatore a 37°C.

## Arresto/Lettura

- Pipettare 50  $\mu\text{L}$  di soluzione bloccante in ciascun pozzetto per arrestare la reazione.
- Leggere e registrare l'assorbanza di ciascun pozzetto a 405 nm.
- Usare un adattamento per curva quadratica per la curva standard. Calcolare i valori di controlli e campioni dalla curva standard.

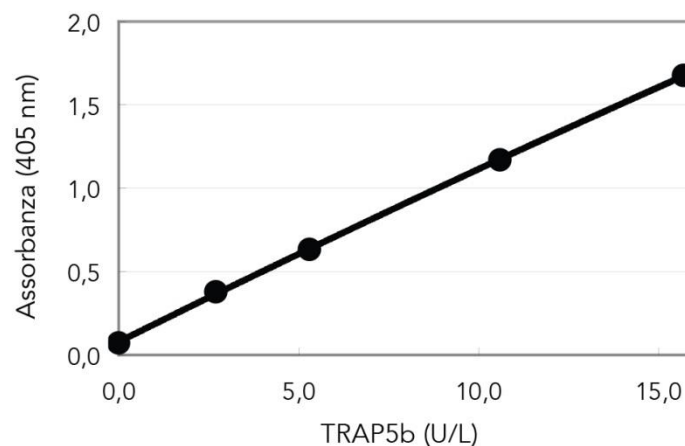
## CONTROLLO DI QUALITÀ

Il certificato di analisi compreso in questo kit è specifico per il lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal laboratorio siano simili a quelli ottenuti da Quidel Corporation.

Vengono forniti i valori di gamma per il controllo di qualità. I valori di controllo sono destinati a verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri per la definizione dei limiti di accettazione del saggio. Se i valori di controllo NON sono all'interno dei limiti di accettazione del laboratorio, i risultati del saggio devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i test dei campioni.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### Curva standard rappresentativa



## VALORI OSSERVATI

Di seguito sono riportati i valori di siero osservati relativamente all'attività TRAP5b in soggetti maschili e femminili sani:

Sesso	Età (Anni)	n	Media (U/L)
Maschio	$\geq 20$	91	$4,0 \pm 1,4$
Femmina (Premenopausa)	30 a 44	31	$2,9 \pm 1,4$
Femmina (Postmenopausa)	$\geq 50$	36	$4,3 \pm 1,5$

Valori TRAP5b osservati (U/L) in 64 adulti sani (ved. informazioni su sesso e età di seguito) usando metodi di raccolta sia di siero che di plasma (eparina). I campioni di plasma sono stati confrontati ai risultati relativi al siero.

- 28 uomini, età 25 a 54 (media: 35,4)
- 36 donne, età 21 a 59 (media: 41,9)

Tipo campione	Media (U/L)	Min	Max	Correlazione (r)
Siero	3,5 ± 1,4	1,2	6,7	–
Eparina plasma	3,6 ± 1,4	1,2	7,3	0,989

## PRESTAZIONI DEL TEST

In questa sezione vengono presentati i dati analitici tipici del saggio MicroVue TRAP5b. Per i valori della curva standard specifica del lotto e dei controlli, fare riferimento al certificato di analisi.

### Sensibilità

Il limite di rilevamento minimo del saggio MicroVue TRAP5b è di 0,2 U/L, determinato dal limite superiore di 3 DS in uno studio di precisione a standard zero.

### Precisione

- Nello stesso saggio (stessa corsa) (n = 16)

Campione	Media (U/L)	Deviazione standard (U/L)	%CV
1	3,4	0,07	2,2
2	7,4	0,14	1,9

- Tra saggi (tra corse) (n = 8)

Campione	Media (U/L)	Deviazione standard (U/L)	%CV
1	3,8	0,11	3,0
2	7,4	0,15	2,0

### Recupero dei picchi

Il recupero dei picchi a 92-103% è stato determinato aggiungendo una quantità nota di TRAP5b purificato ai campioni di siero con livelli diversi di TRAP5b endogeno.

### Linearità

La linearità è stata eseguita diluendo in modo seriale i sieri con diluente per campioni e confrontando i valori osservati con i risultati attesi.

Campione	Fattore di diluizione	Osservato (U/L)	Atteso (U/L)	Recupero (%)
1	non diluito	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	non diluito	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	non diluito	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

## Sostanze interferenti

Le seguenti sostanze sono state sottoposte a test alle concentrazioni specificate e non interferiscono con il saggio.

Sostanza	Concentrazione
Emoglobina	500 mg/dL
Bilirubina F	20 mg/dL
Bilirubina C	20 mg/dL
Lipidi (Intralipid®)	2500 Torbidità
RF (fattore reumatoide)	500 U/mL

Intralipid® è un marchio registrato di Fresenius Kabi AB.

## ASSISTENZA CLIENTI

Per effettuare un ordine o ricevere assistenza tecnica, contattare il distributore locale. Per ulteriori informazioni su Quidel, sui nostri prodotti e sui nostri distributori, visitare il sito web [quidel.com](http://quidel.com).

## BIBLIOGRAFIA

- 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.
- 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](http://quidel.com)

**PI8036000IT00 (02/17)**

## GLOSSARIO

---

**REF**

Numero di catalogo



Marcio CE di conformità

---

**EC REP**

Rappresentante autorizzato  
nella Comunità Europea

**LOT**

Codice lotto

---



Data di scadenza



Produttore

---



Limitazione di temperatura



Uso previsto

---



Leggere le istruzioni e di  
etichettatura per l'uso



Rischio biologico

---

**IVD**

Per uso diagnostico *In Vitro*



Contenuto sufficiente per 96 determinazioni

---

**CONT**

Contenuto / Contiene

**CONTROL**

Controllo

---