

Ensaio enzimático de imunocaptura para a determinação de isoforma 5b de fosfatase ácida tártaro resistente, em soro ou em plasma humanos

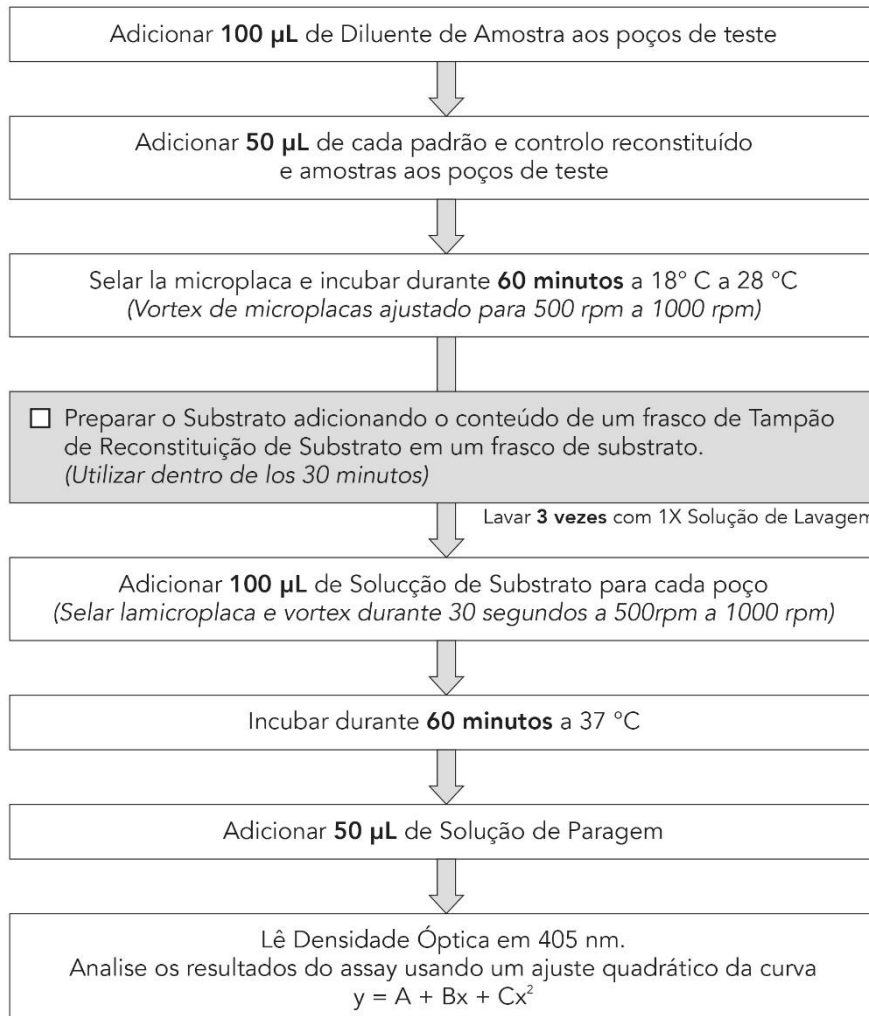
Só para uso diagnóstico *in vitro*. Apenas para exportação. Não se destina a venda ou utilização nos Estados Unidos ou Canadá.

RESUMEN

Preparação do Reagent e Controlo

- Reconstituir padrões com 400 µL de água desionizada (destilada).
(Utilizar dentro de 2 horas)
- Reconstituir Controlos com 400 µL de água desionizada (destilada).
(Utilizar dentro de 2 horas)
- Diluir de 10X Solução de Lavagem 1:10 com água desionizada (destilada)
OBSERVAR: Mistura delicadamente com la pipeta; não faça o vórtice

Procedimento de Ensaio





USO PREVISTO

O ensaio MicroVue TRAP5b é um ensaio enzimático de imunocaptura para a determinação da isoforma 5b da fosfatase ácida tártaro-resistente (TRAcP 5b). O TRAP5b é segregado no soro por osteoclastos ósseos sendo um indicador da actividade dos osteoclastos *in vivo*. Os níveis de actividade de TRAP5b podem ser um indicador útil da actividade dos osteoclastos e por isso, da reabsorção óssea na osteoporose primária e outras doenças.¹⁻⁶

CARACTERÍSTICAS

- Duração total do ensaio: 2 horas.
- O kit mede apenas a actividade de TRAP5b activa.
- As amostras não requerem pré-diluição.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A TRAP5b (fosfatase ácida tártaro resistente, TRAcP 5b; EC 3.1.3.2) é uma glicoproteína com 35-37 kDa. A TRAP5b expressa-se, normalmente, em proporção à actividade dos osteoclastos, e é segregada para a circulação. Diversos estudos investigação indicam que a TRAP5b no soro é um marcador serológico potencialmente útil da reabsorção óssea.⁵

O kit de ensaio MicroVue TRAP5b Assay detecta a actividade enzimática da TRAP5b com base num sistema de ensaio enzimático por imunocaptura.⁵

Pensa-se que níveis elevados de TRAP5b no soro estão associados com a remodelação óssea. Níveis elevados de TRAP5b no soro são observados no crescimento ósseo normal em crianças saudáveis. Foram também detectados níveis elevados de TRAP5b no soro em certas doenças caracterizadas por uma reabsorção óssea elevada¹⁻¹⁴. Alguns exemplos: doença óssea de Paget, hemodiálise, hiper-paratireoidismo primário, tumores com metástases envolvendo reabsorção óssea, mieloma múltiplo e mulheres bilateralmente ovariectomizadas. As mulheres na pós-menopausa sujeitas a terapêuticas de substituição de estrogénios têm normalmente níveis de TRAP5b no soro mais baixos que as mulheres na pos-menopausa não tratadas; portanto, a determinação específica da actividade da TRAP5b pode ser potencialmente utilizada na medição e monitorização do metabolismo ósseo durante a terapêutica.

PRINCIPIO DO PROCEDIMENTO

O ensaio MicroVue TRAP5b é um ensaio EIA com dois passos, captura directa, com 96 poços. As amostras de soro ou plasma, os calibradores reconstituídos e os controlos são adicionados aos micro-poços revestidos, juntamente com o diluente.⁷⁻⁹

Os fragmentos inactivos de TRAP5b, que possam existir no soro, podem interferir com a detecção de TRAP5b em amostras fisiológicas. O ensaio MicroVue TRAP5b evita este tipo de interferência ao utilizar dois anticorpos monoclonais diferentes. Os dois anticorpos monoclonais utilizados, Trk49 e Trk62, são obtidos a partir da imunização do TRAP5b purificado das células ósseas humanas. O primeiro anticorpo: Trk49 é altamente específico para os fragmentos inactivos de TRAP5b. O segundo: Trk62, é altamente específico da TRAP5b activa, intacta. A Trk49 liga fragmentos inactivos da TRAP5b, e com isso torna a TRak62 mais disponível para ligar a TRAP5b activa, no micropoço.

Este ensaio TRAP5b é altamente específico, preciso com uma gama alargada de linearidade. Após o período de incubação, lava-se a placa afim de remover o sobrenadante não ligado e adiciona-se o substrato: fosfato 2-cloro-4-nitrofenil (cNPP, pH 6,4). Dado que o analito TRAP5b é uma enzima, não é necessário um segundo conjugado enzima-anticorpo marcado. No final desta incubação, adiciona-se uma solução 0,2NaOH, para parar a reacção; segue-se a leitura das microplacas a 405 nm. Depois calcula-se a

actividade da TRAP5b a partir de uma curva quadrática. A quantidade de cor desenvolvida é proporcional à concentração de TRAP5b nas amostras.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

40 ensaios para TRAP5b feitos em duplicado (96 poços)

O KIT do ensaio MicroVue TRAP5b tem o seguinte conteúdo:

A	Padrões TRAP5b	Itens 0711631-71	2 x 0,4 mL cada
B	proteína de recombinant composta de TRAP5b Humano (liofilizada). A concentração exacta vem		
C	assinalada em cada frasco.		
D			
E			
L	Controlos	Itens 0711681-91	2 x 0,4 mL cada
H	proteína de recombinant composta de TRAP5b Humano (liofilizada). A gama de concentrações vem assinalada no certificado de análise (C de A).		
1	Placa de micro poço	Item 0711611	12 cada
	12 x 8 poços revestidos com anticorpos anti-TRAP5b monoclonais de murino		
2	Solução de paragem	Item 07116C1	12 mL
	0,2N hidróxido de sódio (NaOH)		
3	10X solução de lavagem	Item 07116D1	100 mL
	TBS/Tween. Contém 0,5 % Tween® 20 e 0,02 % ProClin® 300		
4	Diluyente de amostras	Item 0711621	20 mL
	Tampão Tris. Contém 0,02 % ProClin 300		
5	Tampão de reconstituição de substrato	Item 07116B1	2 x 12 mL
	Tampão MES. Contém 0,02 % ProClin 300		
6	Substrato	Item 07116A1	2 x 12 mL
	Solução de dissolução de substrato, 2-cloro-4-nitrofenyl-fosfate em pó (cNPP)		
	Selo da placa	Item 0047	3 de cada

Tween® 20 é uma marca registrada por ICI Americas Inc.

ProClin® é uma marca registrada por Rohm and Haas Company.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipetas ajustáveis de 50, 100, 300 µL, canal único ou multi-canal.
- Vortex para microplacas, de agitação constante a 500-1000 rpm durante 60 minutos
- A incubadora em 37 °C
- Material de laboratório para medição de líquidos de 10-300 mL
- Água desionizada ou destilada
- Leitor de microplacas para leituras a 405 nm
- Computador com drive de CDROM
- Pacote de Software gerador de dados; curvas quadráticas e análise de dados.
- Aparelhagem própria para lavagem de microplacas
- Pipeta graduada - ou equivalente - de 12 mL
- Materia absorvente I para 'blotting' de microplacas, em processamento, depois da lavagem

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Para diagnóstico *in vitro*.
- Tratar as amostras como material com potencial de risco para a saúde. Adoptar as precauções gerais normais quando se manuseia os componentes do kit e quaisquer amostras de doentes.

- Usar os reagentes fornecidos como uma unidade integral, antes de expirar o prazo de validade indicado na etiqueta da embalagem.
- Conservar os reagentes do ensaio conforme as indicações.
- Não usar tiras revestidas se a bolsa estiver furada.
- Testar cada amostra em duplicado.
- Use luvas e óculos de protecção no manuseamento do kit. Utilize boas práticas laboratoriais para minimizar a exposição.
- O 0,2N NaOH actua como irritante e pode causar irritação nas áreas expostas. Não ingerir. Evitar contacto com a pele, os olhos ou o vestuário. Em caso de contacto lavar com água. No caso de ingestão, consultar o médico.
- Evitar contacto com a solução irritante de substrato que contém cNPP. Em caso de contacto accidental, lavar imediatamente a pele muito bem com sabão e água.
- O ProClin 300 é usado como conservante. Um contacto accidental ou a ingestão de tampões ou reagentes contendo ProClin pode causar irritações na pele, nos olhos ou na boca. Caso se registem sintomas deve procurar-se ajuda médica.
- Recomenda-se o uso de pipetas multi-canal ou de repetição, afim de assegurar a distribuição atempada dos reagentes.
- Para medir as amostras com rigor deve-se adicionar as quantidades exactas de amostras e padrões. Pipetar cuidadosamente servindo-se apenas de equipamento calibrado.
- Executar o ensaio com qualquer método validado de lavagem. Não se deve lavar os poços com uma pipeta multi-canal.
- Executar uma curva padrão para cada ensaio.
- As concentrações dos calibradores são atribuídas a cada lote. Ler cuidadosamente as etiquetas de todos os frascos de Padrões ou os Certificados de Análise.
- Os testes devem ser realizados numa área com ventilação adequada.
- Elimine os recipientes e conteúdo não utilizado de acordo com federais, estatais e requisitos regulamentares locais.
- Usar vestuário adequado, luvas e protecção de rosto e olhos sempre que manusear o conteúdo deste kit.
- Lave bem as mãos após o manuseamento.
- Para obter informações adicionais sobre os símbolos de perigo, segurança, o manuseamento e a eliminação dos componentes contidos neste kit, consulte a Ficha de Dados de Segurança (SDS) disponível em quidel.com.

ARMAZENAMENTO

Conservar o kit a 2 °C a 8 °C. Guardar os reagentes não utilizados a 2 °C a 8 °C. Nestas condições, os componentes do ensaio são estáveis até à data de validade da etiqueta do kit.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

No ensaio MicroVue TRAP5b, as amostras podem ser soro ou plasma (Heparina). Colher o soro recorrendo à técnica normal de venipunção, evitando a hemólise. Deixar o sangue coagular e separar o soro por centrifugação.

As amostras podem ser conservadas até 8 horas à temperatura ambiente; até 2 dias a 2 °C a 8 °C, um mês a -20 °C, e durante um período mais alargado de tempo a -80 °C. Não se deve submeter as amostras a mais de três ciclos de congelação/descongelação.

PREPARAÇÃO DE REAGENTES

Todos os reagentes, devem estar à temperatura ambiente, 18 °C a 28 °C, antes de serem utilizados.

Preparar os reagentes do ensaio como segue:

Diluyente I de amostras

Este diluyente é fornecido pronto a usar.

Padrões

Adicionar 400 µL de água desionizada (destilada) ao frasco que contém padrão liofilizado e dissolver pelo menos durante 5 minutos. Misturar bem. Os padrões reconstituídos devem ser utilizados até um limite de duas horas, se conservados a 18 °C a 28 °C ou até ao máximo de 24 horas se conservados a 4 °C.

Controlos

Adicionar 400 µL de água desionizada (destilada) aos frascos contendo os controlos liofilizados, deixar dissolver no mínimo 5 minutos. Misturar bem. Os controlos reconstituídos devem ser usados até um limite de duas horas se conservados a 18 °C a 28 °C, ou até ao máximo de 24 horas se conservados a 4 °C.

10X tampão de lavagem

Diluir 100 mL de concentrado de Tampão de Lavagem com 900 mL de água desionizada (destilada). O tampão de lavagem activo manter-se-á estável durante um mês a 18 °C a 28 °C.

Solução de Substrato

Preparar o Substrato adicionando o conteúdo de um frasco de Tampão de Reconstituição de Substrato de um frasco de Substrato. Preparar num prazo de 30 minutos em uso.

Solução de paragem

Esta solução é fornecida pronta a usar.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Ler o folheto anexo ao produto antes de começar o ensaio.

Ler AVISOS E PRECAUÇÕES e PREPARAÇÃO DE REAGENTES.

Determine a quantidade de cada reagente necessário para o número de tiras que vão ser utilizadas.

N.º de tiras	4	6	8	12
N.º de amostras (analisadas em duplicado)	8	16	24	40
Substrato (frasco)	1	1	1	1
Tampão de lavagem 1X (mL)	100	150	200	300

Incubação de amostras/enzimas

1. Deixar estabilizar as bolsas com as microplacas à temperatura ambiente, 18 °C a 28 °C, antes de as abrir. Retirar apenas da microplaca o número de tiras de micropoços necessárias. Verificar que a bolsa, contendo as restantes tiras, está hermeticamente fechada e contém dessicante.
2. Pipetar 100 µL de Diluyente de Amostras para os poços.
3. Pipetar 50 µL de cada Padrão, Controlo e amostra para cada poço.
4. Selar a placa da microplaca com a selagem fornecida e incubar 60 minutos a 18 °C a 28 °C num vortex de microplacas ajustado para 500 rpm a 1000 rpm.
5. Após a incubação, lavar 3 vezes os poços das microplacas com um mínimo de 300 µL de solução de lavagem por poço. Depois da lavagem, secar com cuidado usando uma toalha de papel, afim de expelir qualquer resíduo de líquido.

Incubação do Substrato

6. Pipetar 100 µL de solução de substrato para cada poço.

7. Tornar a fechar hermeticamente a microplaca e misturar num vortex de microplacas durante 30 segundos a 500 rpm a 1000 rpm. Depois de agitar, incubar 60 minutos em incubadora a 37 °C.

Parar/Ler

8. Pipetar 50 µL de solução de paragem para cada poço afim de parar a reacção.
9. Ler e registar a absorvância de cada poço a 405 nm tendo como referência filtro a 490 nm.
10. Usar uma regressão quadrática para cada curva padrão. Calcular os valores dos Controlos e amostras a partir da curva padrão.

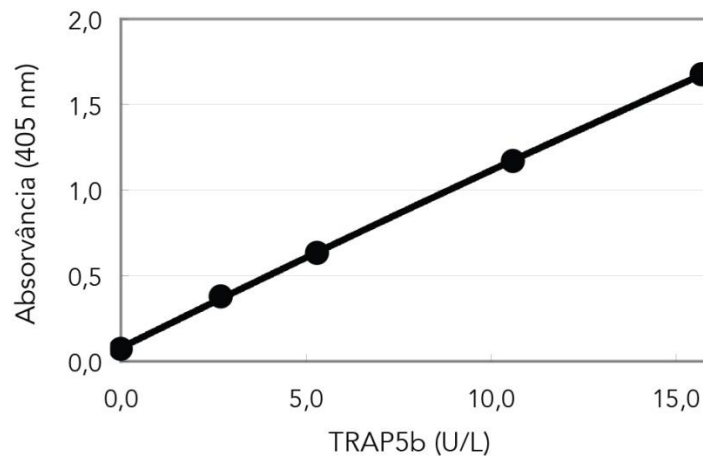
CONTROLO DE QUALIDADE

O Certificado de Análise incluído neste kit é específico do lote e deve usar-se para verificar se os resultados obtidos pelo laboratório são semelhantes aos obtidos pela 'Quidel Corporation'.

Fornecem-se gamas de valores para o controlo de qualidade. Os valores do controlo destinam-se à verificação da validade da curva, e dos resultados das amostras. Cada laboratório deverá estabelecer a sua própria gama de valores. Se os valores dos controlos obtidos NÃO estiverem dentro dos limites de aceitação do laboratório, os resultados do ensaio são questionáveis e devem repetir-se as amostras.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Curva padrão representativa



VALORES OBSERVADOS

Os valores de soro observados para a actividade da TRAP5b em homens e mulheres saudáveis, são os seguintes:

Género	Idade (anos)	n	Média (U/L)
Homens	≥ 20	91	4,0 ± 1,4
Mulheres (Pre-menopausa)	30 a 44	31	2,9 ± 1,4
Mulheres (Pós-menopausa)	≥ 50	36	4,3 ± 1,5

Os valores observados da TRAP5b (U/L) em 64 adultos saudáveis (ver informação sobre género e idade, abaixo) usando métodos de colheita tanto de soro como de plasma (Heparina). As amostras de plasma foram ensaiadas para comparação com os resultados do soro.

- 28 Homens, idades 25 a 54 (média: 35,4)
- 36 Mulheres, idades 21 a 59 (média: 41,9)

Tipo de amostra	Média (U/L)	Min	Max	Correlação (r)
Soro	3,5 ± 1,4	1,2	6,7	–
Plasma Heparina	3,6 ± 1,4	1,2	7,3	0,989

DESEMPENHO DO ENSAIO

Nesta secção apresentam-se os dados analíticos normais do ensaio MicroVue TRAP5b. Consultar o Certificado de Análise para obter dados sobre a curva padrão de lote específico.

Sensibilidade

O limite mínimo de detecção do ensaio MicroVue TRAP5b é de 0,2 U/L, determinado pelo limite superior 3 SD num estudo de precisão de padrão zero.

Precisão

- Intra-ensaios (no ensaio) (n = 16)

Amostra	Média (U/L)	Desvio Padrão (U/L)	%CV
1	3,4	0,07	2,2
2	7,4	0,14	1,9

- Inter-ensaios (ensaio para ensaio) (n = 8)

Amostra	Média (U/L)	Desvio Padrão (U/L)	%CV
1	3,8	0,11	3,0
2	7,4	0,15	2,0

Recuperação

Às amostras foram adicionadas uma quantidade conhecida de TRAP5b purificado, tendo-se obtido uma recuperação de 92-103 %. Estes resultados foram obtidos depois de recuperar as amostras de soro de altas e baixas concentrações de TRAP5b e de as ensaiar em duplicado.

Linearidade

Efectuaram-se diluições sucessivas do soro com o diluente e compararam-se os resultados obtidos com os esperados.

Amostra	Factor Diluição	Observado (U/L)	Esperado (U/L)	Recuperação (%)
1	líquido	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	líquido	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	líquido	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

Substâncias que Interferem

As seguintes substâncias (testadas nas concentrações especificadas) não interferem com o ensaio:

Substância	Concentração
Hemoglobina	500 mg/dL
Bilirubina F	20 mg/dL
Bilirubina C	20 mg/dL
Lípidos (Intralipid®)	2500 Turvação
RF (Rheumatoid Factor)	500 U/mL

Intralipid® é uma marca registrada por Fresenius Kabi AB.

APOIO A CLIENTES

Para fazer uma encomenda ou pedir assistência técnica, é favor contactar seu distribuidor local.

Para mais informações sobre a Quidel, sobre os nossos produtos e os nossos distribuidores, consulte o nosso 'sítio' na Internet, no seguinte endereço: quidel.com.

REFERÊNCIAS

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

PI8036000PT00 (02/17)

GLOSSÁRIO

REF

Número de catálogo



Marca CE de conformidade

EC REP

Representante autorizado na Comunidade Europeia

LOT

Número do lote



Utilizar até



Fabricante



Limitação de temperatura



Utilização prevista



Consulte as instruções e-rotulagem de utilização



Risco biológico

IVD

Para diagnóstico *in vitro*



Contém o suficiente para 96 determinações

CONT

Conteúdo / Contem

CONTROL

Controlo
