
BoneTRAP® (TRAcP 5b) ELISA

SB-TR201A

English/Français/Deutsch/Español/Italiano

CE

Example Version

BoneTRAP® (TRAcP 5b) ELISA

Test for the quantitative determination of the active isoform 5b of the tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP)

Cat. no.: SB-TR201A

For in vitro diagnostic use only

Introduction

High amount of tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) is expressed by bone-resorbing osteoclasts and activated macrophages (1). Two forms of TRACP circulate in human blood, known as TRACP 5a and TRACP 5b (2). TRACP 5b is derived from osteoclasts and TRACP 5a from macrophages (3).

Osteoclasts secrete TRACP 5b into the blood circulation as an active enzyme that is inactivated and degraded to fragments before it is removed from the circulation. Thus, TRACP 5b activity does not accumulate into the circulation in renal or hepatic failure (4,5). All serum TRACP 5b activity is derived from osteoclasts. Diurnal variability of serum TRACP 5b activity is low and the levels are not affected by feeding, allowing sample collection at any time of day (5).

The BoneTRAP® assay is a specific method to detect TRACP 5b activity freshly liberated from osteoclasts. It is intended for use as an indicator of bone resorption and can be used as an aid in monitoring bone resorption changes in post-menopausal women and individuals diagnosed with osteoporosis undergoing anti-resorptive therapies (HRT and bisphosphonates) (4, 6-18). *In vitro*, TRACP 5b activity reflects the number of osteoclasts (15,19), and therefore the BoneTRAP® Assay can be conveniently used to determine osteoclast number in human osteoclast cultures.

Test principle



The plate is coated with anti-TRACP antibodies (mo-noclonal).

Calibrators, Control and patient samples are added.

Releasing reagent is added.

Dissociation of active TRACP 5b from the binding proteins.

TRACP 5b is bound by the anti-TRACP antibodies.

Incubation with pNPP substrate (*).

The reaction is stopped by adding sodium hydroxide. The absorption is read photometrically.

Advantages of the test

- ◆ Measures TRACP 5b activity that is released specifically from osteoclasts.
- ◆ No interference with TRACP 5a or other phosphatases.
- ◆ Hemolysis has no effect on results.
- ◆ No diurnal variation.
- ◆ Not affected by functional disorders of kidney and liver.
- ◆ No dietary influences.

KIT CONTENTS

Cat. no.: SB-TR201A

1. **MICROPLAT** Microplate: 12 x 8 wells (with frame and desiccant in aluminium bag), F-form, coated with monoclonal anti-TRACP antibody (mouse) and BSA, ready to use.
2. **CTRL** Controls: 2 x 2 vials with 0.5 ml each, human recombinant TRACP, lyophilized, Xn, Harmful, R 22-52/53, S 36-60, contains < 1 % sodium azide and BSA.
3. **CAL** Calibrators: 2 x 6 vials with 0.5 ml each, human recombinant TRACP, lyophilized, Xn, Harmful, R 22-52/53, S 36-60, contains < 1 % sodium azide and BSA. The exact value of each calibrator is printed on the Quality Control Report.
4. **WASHBUF 25X** Wash Buffer: 1 bottle with 40 ml TBS/Tween (25x conc.), pH 7.65 – 7.85, contains < 1 % Germall®II.
5. **SAMPDIL** Sample Diluent: 1 vial with 15 ml, sodium chloride solution, ready to use, contains < 1 % Germall®II.
6. **RELEASREAG** Releasing Reagent: 1 vial with 8 ml, pH 6.9 – 7.1, ready to use, contains < 1 % Germall®II.
7. **SUBSBUF** Substrate Buffer: 2 vials with 10 ml each, sodium acetate buffer, pH 5.95 – 6.05, ready to use, contains < 1 % Germall®II.
8. **SUBS pNPP** Substrate Tablets: 4 tablets, contain p-nitrophenyl phosphate (pNPP).
5. **NaOH** Stop Solution: 1 vial with 6 ml, 0.32 M sodium hydroxide, ready to use, Xi, Irritant, R 36/38, S 26-37-60

1. STORAGE AND STABILITY

MATERIAL/REAGENT	STATE	STORAGE	STABILITY
Test kit	unopened	2...8 °C	until expiry date
Microplate	opened	2...8 °C in bag with desiccant	6 weeks
Control	reconstituted	-18 °C or below	6 weeks
Calibrators	reconstituted	-18 °C or below	6 weeks
Substrate Buffer	opened	2...8 °C	6 weeks
Wash Buffer	diluted	2...8 °C	6 weeks
Sample Diluent	opened	2...8 °C	6 weeks
Releasing Reagent	opened	2...8 °C	6 weeks
Stop Solution	opened	2...8 °C	6 weeks

Do not use the reagents after the expiry date.

Note:

The specimens storage and stability information stated above are general recommendations for use in a variety of settings of laboratories. Each laboratory should follow the guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations to establish its own specimens handling and storage stability. For guidance on appropriate practices, please refer to the CLSI GP-44A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline – Fourth Edition.

2. REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 2.1. Deionised (DI) water.
- 2.2. Adjustable micropipettes.
- 2.3. Clean glass or plastic containers for dilution of Wash Buffer and specimen.
- 2.4. Suitable device for microplate washing (e.g. multistepper or ELISA washer).
- 2.5. Incubator for 37 °C.
- 2.6. Microplate shaker, shaking frequency 850–950 rpm, amplitude 4 mm.
- 2.7. Microplate reader with filter for 405 nm.

3. PREPARATION OF THE REAGENTS

Before starting the test procedure all kit components must be equilibrated to room temperature.

Calculate the number of wells required.

3.1. Microplate

The aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant after each removal of wells. Storage and stability of the wells are indicated in table 1.

3.2. Wash Buffer

Mix one volume of Wash Buffer (25x) with 24 volumes of water for injection (e.g. 10 ml Wash Buffer (25x) with 240 ml water). Seven ml of diluted wash buffer is needed for 8 wells.

3.3. Calibrators

Reconstitute the lyophilised calibrators each with 0.5 ml of water for injection. Reconstitution time 15 min.

3.4. Controls

Reconstitute the lyophilised controls with 0.5 ml of water for injection. Reconstitution time 15 min.

3.5. Substrate Solution

1 Substrate Tablet is dissolved in 5 ml Substrate Buffer.

The Substrate Solution must not be stored.

Do not mix reagents from different lots or manufacturers.

Valid and reproducible results are only obtained if the test procedure is precisely followed and test kit-specific reagents are used.

4. SPECIMEN

- 4.1. The assay is suitable for serum and EDTA-plasma samples.
NB. The same specimen type must be used throughout a follow-up study.
- 4.2. Pretreatment of sera, e.g. inactivation, must not be performed. The specimen should not be contaminated with microorganisms
- 4.3. Specimen can be stored up to 8 hours at room temperature and up to 3 days at 2-8 °C. Storage at -20 °C is possible for 2 months. For longterm storage a temperature of -80 °C is necessary.
- 4.4. Samples are used undiluted. Specimen above the measuring range can be diluted up to 1:5.

5.A. TEST PROCEDURE

- 5.1. Cut the aluminium bag above the zip fastener and take out the required number of microplate wells (see 3.1.).

Microplate wells are ready to use and do not have to be pre-washed.

NB! Microplate 12x8 wells.

- 5.2. Add 100 µl each of Calibrators, Control and samples to the wells of the plate in duplicate.
- 5.3. Add 50 µl Releasing Reagent to each well.
- 5.4. Seal the microplate with incubation cover foil and incubate for 60 min (± 5 min) at room temperature with constant shaking at 850–950 rpm.
- 5.5. After incubation wash the microplate wells four times with 300 µl wash buffer per well. Pay attention that all wells are filled. After washing tap microplate wells on filter paper.

Do not allow the wells to dry out! Proceed immediately!

- 5.6. Add 100 µl Substrate Solution to each well.
- 5.7. Seal the microplate with incubation cover foil and incubate for 60 min (± 5 min) at 37 °C (± 1 °C).
- 5.8. Stop the reaction by adding 25 µl of Stop Solution to each well.

Ensure for a good mixing by shaking gently.

Clean microplate wells from underneath before the photometric reading and take care that there are no air bubbles in the wells.

The reading should be done within 15 min after adding the Stop Solution!

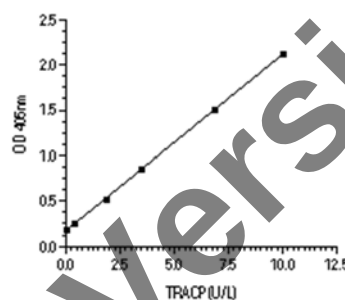
5.B TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Calibrators	Control	Sample
Calibrators	100 µl	-	-
Controls	-	100 µl	-
Sample	-	-	100 µl
Releasing Reagent	50 µl	50 µl	50 µl
Incubate for 60 min (± 5 min) at room temperature with constant shaking at 850–950 rpm, wash 4 x with 300 µl wash buffer.			
Substrate Solution	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for 60 min (± 5 min) at 37 °C (± 1 °C).			
Stop Solution	25 µl	25 µl	25 µl
Photometric reading at 405 nm			

6.A. CALCULATION OF RESULTS (VALIDITY)

- Read OD values at 405 nm.
- The average OD values of the calibrators are plotted against the activity values.
- The calibration line is calculated by linear regression.
- The measuring range spans from 0.5 to 10 U/L. Samples below the measuring range have to be interpreted as < 0.5 U/L. Samples with activities above the measuring range have to be interpreted as > 10 U/L. These values must not be extrapolated but the samples should be retested diluted (up to 1:5).
- The TRACP 5b activities of the controls and the samples can be read from the calibration line. If diluted samples have been used the dilution factor has to be considered.

Example for calibration line



- Lot-specific data
- Refer to Quality Control Report.
- Validity criteria
- The average OD of the 0 U/L calibrator has to be < 0.400.
- The activity of the control has to be within the nominal range. Refer to Quality Control Report for assigned range.
- The correlation coefficient (r^2) of the calibration line has to be ≥ 0.99

Repeat the run if the results do not meet the specification!

6.B INTERPRETATION OF RESULTS/LIMITATIONS OF THE METHOD

- Increased TRACP 5b activity (see 7.E.) indicates an increased bone resorption.
- Results within the reference range do not exclude disorders in bone metabolism completely. Therefore all results should always be interpreted in connection with clinical data and additional diagnostic parameters.
- High concentrations of hemoglobin do not influence the test results.
- High lipid concentrations may reduce the OD values and distort the TRACP activity.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We determined the following performance characteristics during the evaluation of the assay.

7.A. PRECISION

Sample	Intra-assay variation (n = 21)			Sample	Inter-assay variation (n = 11)		
	mean U/L	SD	CV (%)		mean U/L	SD	CV (%)
Control	3.0	0.18	6.0	Control	3.3	0.19	5.8
N° 1	2.6	0.25	9.6	N° 1	2.5	0.23	9.2
N° 2	3.1	0.43	13.9	N° 2	4.2	0.35	8.3
N° 3	7.1	0.47	6.6	N° 3	7.0	0.62	8.9
				N° 4	7.2	0.38	5.4
				N° 5	2.6	0.23	8.8
				N° 6	16.1	1.16	7.2

7.B. RECOVERY

By adding 3 defined TRACP 5b activities each to 3 different sera a mean recovery of 100.9 % (SD = 11.3 %) was determined.

7.C. DILUTION LINEARITY

A linearity was determined by using sera of different activity (n=5). Samples with high TRACP 5b activity can be diluted up to 1:5 with Sample Diluent.

7.D. LIMIT OF QUANTITATION

The limit of quantitation is < 0.5 U/L.

7.E. EXPECTED VALUES

Expected values of TRACP 5b were determined from the serum of 239 healthy blood donors as follows:

Example Version

Group	n	Mean Age (range)	TRACP 5b (U/L) Mean $\pm$ SD
Healthy premenopausal women	144	39.5 (22 – 54)	2.59 $\pm$ 0.78
Healthy young men	32	36.0 (22 – 54)	3.06 $\pm$ 0.88
Healthy postmenopausal women	46	60.3 (41 – 81)	3.19 $\pm$ 0.85
Healthy old men	17	68.5 (55 – 79)	3.31 $\pm$ 0.72

Upper limits of normal were calculated as the mean + 2 SD of premenopausal women (for women) and young men (for men):

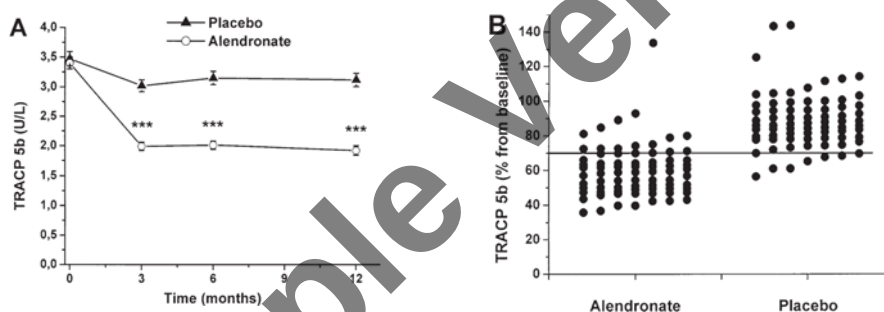
Group	Upper normal limit (mean + 2SD)
Women	4.15 U/L
Men	4.82 U/L

8. CLINICAL IMPORTANCE

TRACP 5B ACTIVITY IN POSTMENOPAUSAL WOMEN UNDER ALENDRONATE THERAPY

(see ref. 14)

TRACP 5b values were determined from the serum of postmenopausal women receiving 5 mg alendronate daily for 12 months in a placebo-controlled study. All subjects in the placebo (n = 73) and alendronate (n = 75) groups received a daily supplement of 630 mg calcium carbonate and 200 IU vitamin D.



A) Serum TRACP 5b activity (U/L) before the start of treatment (0) and at 3, 6 and 12 months; B) The change of serum TRACP 5b at 3 months. Each spot shows the value of one individual at 3 months compared with the value obtained for the same individual at baseline (before the start of treatment). The line in B) shows the Least Significant Change (LSC = 29.5%). A decrease of more than LSC was observed for 82.7% of the individuals in the alendronate group, and 11.0% of the individuals in the placebo-group.

GENERAL HANDLING ADVICES

- * To avoid cross contamination do not exchange the vials and their screw caps.
- * The reagents have to be sealed immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- * After use, the reagents have to be stored as indicated to guarantee the shelf life.
- * After use, all components of the testkit should be stored in the original package, in order to avoid mixing up the reagents of other test systems or lots (see also 3.).

HEALTH AND SAFETY INFORMATION

- * The local occupational safety and health regulations have to be regarded.
- * Reagents of animal origin (see kit contents) should be handled as potentially infectious and used with all necessary precautions.

Classification under CLP:

Acute Tox. 4:

Aquatic Chronic 3:

EUH032

Hazard statements:

EUH032: Contact with acids liberates very toxic gas.

H302: Harmful if swallowed.

H315: Causes skin irritation.

H319: Causes serious eye irritation.

H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Precautionary statements:

P264: Wash hands thoroughly after handling.

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P270: Do not eat, drink or smoke when using this product.

P301+310: IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor.

P305+351+338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P330: Rinse mouth

Wash Buffer, Sample Diluent, Releasing Reagent and Substrate Buffer contain Germall®II (diazolidinyl urea): May produce an allergic reaction.

DISPOSAL CONSIDERATIONS

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

References/Références/Literatur/Bibliografia/Bibliografia

1. Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, Martin AW, Yam LT 1995 Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol* 104:397-402.
2. Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ 1981 Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem* 14:177-181.
3. Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, Halleen JM, Hentunen T, Yam LT 2002 Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 320:49-58.
4. 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.
5. Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari AA, Eastell R, Blumsohn A 2004 Clinical performance of immunoreactive tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34:187-194.
6. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK 2000 Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:1337-1345.
7. 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.
8. Albertini B, Casez JP, Cheneval JP, Wauters JP, Jaeger PH 2002 Low levels of 25-hydroxy-vitamin D3 (25OHD) and high serum tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) activity in hemodialysis patients: relationship to secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 13:571A-572A.
9. Halleen JM 2003 Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption (Review). *Anticancer Res* 23(2A):1027-1029.
10. Chu P, Chao TY, Lin YF, Janckila AJ, Yam LT 2003 Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 41:1052-1059.
11. Reichel H, Esser A, Roth HJ, Schmidt-Gayk H 2003 Influence of PTH Assay Methodology on Differential Diagnosis of Renal Bone Disease. *Nephrol Dial Transplant* 18:759-768.
12. Mehlhorn AT, Rech H, Stemberger AW, Grading R 2002 Immunological and histochemical determination of TRAP 5b to measure osteoclast activity under antiosteolytic treatment. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P21.
13. Stepan JJ, Burckhardt P 2002 Serum activity of type 5b ACP and biochemical markers of type I collagen degradation in osteoporotic men with Klinefelter's syndrome treated with an intravenous ibandronate. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P79.
14. Halleen JM, Nenonen AM, Alatalo SL, Ivaska KK, Cheng S, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Väänänen HK 2003 Comparison of serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b with other markers of bone turnover in monitoring alendronate therapy. *J Bone Miner Res* 18(Suppl.1), Abstract SA104.
15. Rissanen JP, Hentunen TA, Halleen JM 2003 Development and characterization of a novel human in vitro bone resorption assay useful for preclinical testing of drug candidates. *J Bone Miner Res* 18(suppl.1), Abstract SA256.
16. Terpos T, Viniou N, de la Fuente J, Meletis J, Voskaridou E, Karkantaris C, Vaiopoulos G, Palermos J, Yataganas X, Goldman J, Rahemtulla 2003 Pamidronate is superior to ibandronate in decreasing bone resorption, interleukin-6 and beta 2-microglobulin in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 70:34-42.
17. Truniger R, Popp AWE, Perrelet R, Noesberger A, Lippuner K 2003 Effects of a 12 months risedronate treatment on biochemical markers of bone turnover and on serum osteoprotegerin and soluble receptor activator of NF- κ B ligand in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 18(suppl. 1), Abstract SU341.
18. Voskaridou E, Terpos E, Spina G, Palmeros J, Rahemtulla A, Loutradi A, Loukopoulos D 2003 Pamidronate is an effective treatment for osteoporosis in patients with beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 1234:730-737.
19. Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK 2000 Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46:1751-1754.

SB-TR201A
Version 09
03 June 2015

 EXP	GB <i>Use By</i> DE <i>Verwendbar bis</i> ES <i>Fecha de caducidad</i> IT <i>Utilizzare entro</i> FR <i>Utiliser jusqu'à</i> NL <i>Houdbaar tot</i> DK <i>Holdbar til</i> CZ <i>Použitelné do</i> SK <i>Použitelné do</i> GR <i>Ημερομηνία λήξης</i> PT <i>Prazo de validade</i> HU <i>Felhasználható</i> SE <i>Använd före</i> PL <i>Użyć przed</i>	 LOT	GB <i>Batch code</i> DE <i>Chargenbezeichnung</i> ES <i>Código de lote</i> IT <i>Codice del lotto</i> FR <i>Code du lot</i> NL <i>Lot nummer</i> DK <i>Lotnummer</i> CZ <i>Číslo šarže</i> SK <i>Číslo šarže</i> GR <i>Αριθμός Παρτίδας</i> PT <i>Código do lote</i> HU <i>Sarzszzám</i> SE <i>Lot nummer</i> PL <i>Kod partii</i>
 REF	GB <i>Catalogue number</i> DE <i>Bestellnummer</i> ES <i>Número de catálogo</i> IT <i>Numero di catalogo</i> FR <i>Référence du catalogue</i> NL <i>Catalogus nummer</i> DK <i>Katalognummer</i> CZ <i>Katalogové číslo</i> SK <i>Katalógové číslo</i> GR <i>Αριθμός καταλόγου</i> PT <i>Referência de catálogo</i> HU <i>Katalógusszám</i> SE <i>Katalognummer</i> PL <i>Numer katalogowy</i>		GB <i>Manufacturer</i> DE <i>Hersteller</i> ES <i>Fabricante</i> IT <i>Fabbricante</i> FR <i>Fabricant</i> NL <i>Fabrikant</i> DK <i>Producent</i> CZ <i>Výrobce</i> SK <i>Výrobca</i> GR <i>Κατασκευαστής</i> PT <i>Fabricante</i> HU <i>Gyártó</i> SE <i>Tillverkare</i> PL <i>Producent</i>
	GB <i>Contains sufficient for <n> tests</i> DE <i>Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen</i> ES <i>Contenido suficiente para <n> ensayos</i> IT <i>Contenuto sufficiente per "n" saggi</i> FR <i>Contenu suffisant pour "n" tests</i> NL <i>Inhoud voldoende voor "n" testen</i> DK <i>Indeholder tilstrækkeligt til "n" test</i> CZ <i>Lze použít pro <n> testů</i> SK <i>Obsah postačuje na <n> stanovení</i> GR <i>Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις</i> PT <i>Conteúdo suficiente para "n" ensaios</i> HU <i>A doboz tartalma <n> vizsgálat elvégzéséhez elegendő</i> SE <i>Räcker till "n" antal tester</i> PL <i>Wystarczy na wykonanie <n> testów</i>	 IVD	GB <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i> DE <i>In-Vitro-Diagnostikum</i> ES <i>Producto sanitario para diagnóstico in vitro</i> IT <i>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</i> FR <i>Dispositif médical de diagnostic in vitro</i> NL <i>Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek</i> DK <i>Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik</i> CZ <i>In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek</i> SK <i>Zdravotnícka pomôcka in vitro</i> GR <i>Ιn Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν</i> PT <i>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro</i> HU <i>In vitro diagnosztikum</i> SE <i>Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik</i> PL <i>Wyrób do diagnostyki In Vitro</i>
	GB <i>Temperature limitation</i> DE <i>Temperaturbegrenzung</i> ES <i>Límite de temperatura</i> IT <i>Limiti di temperatura</i> FR <i>Limites de température</i> NL <i>Temperatuurlimiet</i> DK <i>Temperaturbegrænsning</i> CZ <i>Teplotní rozmezí od do</i> SK <i>Teplotné rozmedzie od do</i> GR <i>Περιορισμοί θερμοκρασίας</i> PT <i>Limites de temperatura</i> HU <i>Hőmérséklettartomány</i> SE <i>Temperaturbegränsning</i> PL <i>Przestrzegać zakresu temperatury</i>		GB <i>Consult Instructions for Use</i> DE <i>Gebrauchsanweisung beachten</i> ES <i>Consulte las instrucciones de uso</i> IT <i>Consultare le istruzioni per l'uso</i> FR <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> NL <i>Raadpleeg de gebruiksaanwijzing</i> DK <i>Se brugsanvisning</i> CZ <i>Viz návod k použití</i> SK <i>Viď návod na použitie</i> GR <i>Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης</i> PT <i>Consulte as instruções de utilização</i> HU <i>Nézze meg a Használati utasítást</i> SE <i>Se handhavandebeskrivningen</i> PL <i>Sprawdź w instrukcji obsługi</i>

	GB <i>EU Importer</i>
	DE <i>EU-Importeur</i>
	ES <i>UE Importador</i>
	IT <i>Importatore UE</i>
	FR <i>Importateur UE</i>



Immunodiagnostic Systems Limited,
 10 Didcot Way, Boldon Business Park,
 Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
 Tel.: +44 191 519 0660
 Fax: +44 191 519 0760
 E-Mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com



IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
 Herriotstrasse 1
 60528 Frankfurt am Main
 Germany

BoneTRAP® (TRAcP 5b) ELISA

Test pour la détermination quantitative de l'isoforme active 5b de la phosphatase acide tartrate résistante (TRACP)

Cat. no.: SB-TR201A

Usage diagnostique *in vitro*.

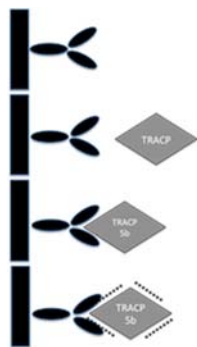
Introduction

La Phosphatase Acide Osseuse résistante au tartrate (TRACP) est exprimée par les ostéoclastes et par l'activation des macrophages (1). Deux formes de la TRACP circulent dans le sang humain : la TRACP 5a et la TRACP 5b (2). La TRACP 5b est dérivée des ostéoclastes, la TRACP 5a des macrophages (3).

Les ostéoclastes sécrètent la TRACP 5b dans la circulation sanguine en forme d'une enzyme active qui est inactivée et dégradée en fragments avant d'être supprimée de la circulation. Par conséquent, l'activité de la TRACP 5b ne s'accumule pas dans la circulation en cas d'insuffisance rénale ou hépatique (4,5). Toute l'activité de la TRACP 5b dans le sérum est dérivée des ostéoclastes. La variabilité diurnale de l'activité de la TRACP 5b sérique est basse et les niveaux ne sont pas affectés par l'alimentation, ce qui permet de collecter les échantillons à toute heure de la journée (5).

L'essai BoneTRAP® est une méthode spécifique pour détecter l'activité de la TRACP 5b libérée des ostéoclastes. Le test peut ainsi déterminer un taux de résorption osseuse anormal chez les sujets atteints d'ostéoporose primaire ou de maladies osseuses rénales (4, 6-11). L'essai BoneTRAP® peut être employé également dans le suivi de l'efficacité des traitements d'anti-résorption (6,9,12-18). *In vitro*, l'activité de la TRACP 5b medium reflète le nombre d'ostéoclastes (15,19), et l'essai BoneTRAP® peut ainsi déterminer le nombre d'ostéoclastes dans les cultures d'ostéoclastes humains.

PRINCIPE DU TEST



Les puits sont revêtus d'anticorps anti-TRACP (monoclonaux).

Les étalons, contrôles et échantillons de patients sont ajoutés.

Le réactif de dissociation est ajouté.

Dissociation du TRACP 5b actif des protéines liées. Le

TRACP 5b est lié par les anticorps anti-TRACP.

Incubation avec le substrat pNPP (*).

La réaction est stoppée par l'addition d'hydroxide de sodium. L'absorption est lue par un photomètre

Avantages du test

- ♦ Mesure l'activité TRACP 5b venant spécifiquement des ostéoclastes
- ♦ Pas d'interférence avec la TRACP 5a ni d'autres phosphatases
- ♦ Pas d'influence de l'hémolyse sur les résultats
- ♦ Pas de variations diurnales.
- ♦ Pas affecté par les désordres fonctionnels rénaux et hépatiques.
- ♦ Pas d'influence due au régime alimentaire.

CONTENU DU KIT

CAT. NO.: SB-TR201A

1. **MICROPLAT** Microplaque: 12 x 8 puits en F (avec support et déshydratant dans un sachet d'aluminium), revêtus des anticorps monoclonaux anti-TRACP (souris) et de BSA, prêt à l'emploi.
2. **CTRL** Contrôles: 2 x 2 flacons de 0,5 ml chacun, TRACP humain recombinant, lyophilisé, Xn, nocif, R 22-52/53, S 36-60, contenant < 1 % d'azide de sodium et de BSA.
3. **CAL** Etalons: 2 x 6 flacons de 0,5 ml chacun, TRACP humain recombinant, lyophilisé, Xn, nocif, R 22-52/53, S 36-60, contenant < 1 % d'azide de sodium et de BSA.
La valeur exacte de chaque étalon est indiquée sur le rapport du contrôle de qualité
4. **WASHBUF 25X** Tampon de Lavage: 1 flacon de 40 ml TBS/Tween (25x conc.), pH 7,65 – 7,85, contenant < 1 % Germall® II.
5. **SAMPDIL** Diluant Echantillon: 1 flacon de 15 ml, solution de chlorure de sodium, prête à l'emploi, contenant < 1 % Germall® II.
6. **RELEASEAG** Agent de Dissociation: 1 flacon de 8 ml, pH 6,9 – 7,1, prêt à l'emploi, contenant < 1 % Germall® II.
7. **SUBSBUF** Tampon de Substrat: 2 flacons de 10 ml chacun, tampon acétate de sodium, pH 5,95 – 6,05, prêt à l'emploi, contenant < 1 % Germall® II.
8. **SUBS pNPP** Tablettes de Substrat: 4 tablettes, contenant du p-nitrophenyl phosphate (pNPP).
9. **NaOH** Solution d'arrêt: 1 flacon de 6 ml, 0,32 M hydroxide de sodium, prête à l'emploi, Xi, irritant, R 36/38, S 26-37-60.

1. CONSERVATION ET STABILITE

MATERIEL/REACTIFS	ETAT	CONSERVATION	STABILITE
Trousse	Non ouvert	2...8 °C	Jusqu'à la date de péremption
Microplaque	Ouvert	2...8 °C dans la pochette avec dessicant	6 semaines
Contrôle	Reconstitué	-18 °C ou endessous	6 semaines
Etalons	Reconstitués	-18 °C ou endessous	6 semaines
Tampon de Substrat	Ouvert	2...8 °C	6 semaines
Tampon de Lavage	Dilué	2...8 °C	6 semaines
Diluant Echantillon	Ouvert	2...8 °C	6 semaines
Agent de Dissociation	Ouvert	2...8 °C	6 semaines
Solution d'arrêt	Ouvert	2...8 °C	6 semaines
Ne pas utiliser les réactifs après la date de			

Les informations sur le stockage et la stabilité des échantillons mentionnées plus haut sont des recommandations générales destinées à être utilisées dans différents types de laboratoires. Chaque laboratoire doit se conformer aux directives ou aux exigences de la réglementation locale, nationale et/ou fédérale, ou bien à celles des organismes d'accréditation pour définir ses propres procédures de manipulation des échantillons et de stabilité de stockage. Pour plus de détails sur les pratiques appropriées, merci de vous référer à CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

2. REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- 2.1. D'eau désionisée.
- 2.2. Micropipettes réglables.
- 2.3. Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution du Tampon de Lavage et des sérums de patients.
- 2.4. Dispositif de lavage des microplaques (par exemple multistepper ou ELISA washer).
- 2.5. Incubateur à 37 °C.
- 2.6. Agitateur pour microplaques, fréquence d'agitation 850–950 rpm, amplitude 4 mm.
- 2.7. Lecteur de plaque avec filtre à 405 nm.

3. PREPARATION DES REACTIFS

Amener tous les réactifs et les échantillons cliniques à analyser à température ambiante.

Calculer le nombre de puits nécessaires.

- 3.1. Microplaque
La pochette en aluminium doit être refermée soigneusement avec le dessicant après chaque enlèvement de puits. Conservation et stabilité des puits sont indiqués dans le tableau 1.
- 3.2. Tampon de Lavage
Mélanger un volume de Tampon de Lavage (25x) avec 24 volumes d'eau pour injection (par ex. 10 ml de Tampon de Lavage (25x) avec 240 ml d'eau). 7 ml de Tampon de Lavage dilué sont nécessaires pour 8 puits.
- 3.3. Etalons
Reconstituer chacun des Etalons lyophilisés avec 0,5 ml d'eau pour injection. Temps de reconstitution: 15 minutes.
- 3.4. Contrôles
Reconstituer le Contrôles lyophilisé avec 0,5 ml d'eau pour injection. Temps de reconstitution : 15 minutes.
- 3.5. Solution de Substrat
1 Tablette de Substrat est dissoute dans 5 ml de Tampon de Substrat.

La solution de substrat ne peut pas être conservée.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots ou fabricants.

Des résultats valides et reproductibles sont obtenus seulement si la procédure de test est suivie précisément et si les réactifs spécifiques de la trousse sont utilisés.

4. ECHANTILLONS

- 4.1. L'essai convient pour les échantillons sériques .

à noter : le même type d'échantillon doit être utilisé pour une étude complémentaire

- 4.2. Le prétraitement des séra, par ex. inactivation, ne doit pas être réalisé. Les spécimens n doivent jamais être contaminés par des microorganisms
- 4.3. Les spécimens peuvent être conservés jusqu'à 8 heures à température ambiante et 3 jours à 2 – 8 °C. La conservation à 20 °C est possible pendant 2 mois. Pour une conservation à long terme, une température de – 80 °C est nécessaire.
- 4.4. Les échantillons sont utilisés non dilués. Les spécimens au-dessus de la gamme de mesure peuvent être dilués jusqu'à 1:5.

5.A. PROCEDURE DU DOSAGE

- 5.1. Découper la pochette en aluminium au-dessus de la fermeture rapide et prendre le nombre de puits nécessaires (voir 3.1.).

Les puits sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être prélevés.

- 5.2. Ajouter 100 µl, en double, de chaque Etalon, Contrôle et Echantillon dans les puits de la microplaque.
- 5.3. Ajouter 50 µl d'Agent de Dissociation à chaque puit.
- 5.4. Couvrir la microplaque avec un film pour incubation et incuber pendant 60 min. (± 5 min.) à température ambiante sous agitation constante à 850-950 rpm.
- 5.5. Après incubation, laver les puits 4 fois avec 300 µl de Tampon de lavage par puit. Faire attention à ce que tous les puits soient remplis. Après lavage, taper la microplaque sur du papier absorbant.

Ne pas laisser sécher les puits! Continuer la procédure immédiatement !

- 5.6. Ajouter 100 µl de solution de substrat à chaque puit.
- 5.7. Couvrir la microplaque avec un film pour incubation et incuber pendant 60 min. (± 5 min.) à 37 °C (± 1 °C).
- 5.8. Stopper la réaction par addition de 25 µl de Solution d'arrêt à chaque puit.

Assurer un bon mélange par une légère agitation.

Nettoyer le dessous des puits avant la lecture photométrique et regarder s'il n'y a pas de bulles d'air dans ceux-ci.

La lecture doit être effectuée endéans les 15 min. après avoir ajouté la Solution d'arrêt !

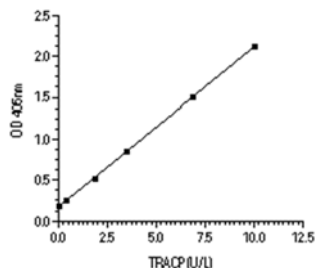
5.B. TABLEAU POUR LA PROCEDURE DU TEST

	Calibrateurs	Contrôle	Echantillons
Etalons	-	100 µl	-
Contrôles	-	-	100 µl
Echantillon	-	-	-
Agent de Dissociation	50 µl	50 µl	50 µl
Incuber pendant 60 min. (± 5 min.) à température ambiante sous agitation constante à 850-950 rpm, laver 4 x avec 300 µl de Tampon de Lavage.			
Solution de substrat	100 µl	100 µl	100 µl
Incuber pendant 60 min.(± 5 min.) à 37 °C (± 1 °C.)			
Solution d'arrêt	25 µl	25 µl	25 µl
Lecture photométrique à 405 nm			

6.A. CALCUL DES RESULTATS (VALIDITE)

- * Lire les DO à 405 nm.
- * Les valeurs moyennes de DO des calibrateurs sont mises en graphique par rapport aux valeurs d'activité. La droite de calibration est calculée par régression linéaire.
- * L'échelle de mesure s'étend de 0,5 à 10 U/L. Les échantillons en dessous de la valeur inférieure doivent être interprétés comme < 0,5 U/L. Les échantillons ayant des activités supérieures à l'échelle de mesure doivent être interprétés comme > 10 U/L. Ces valeurs ne peuvent pas être extrapolées mais ces échantillons doivent être retestés dilués (jusqu'à 1:5).
- Les activités TRACP 5b du contrôles et des échantillons peuvent être lues à partir de la courbe de calibration. Si des échantillons dilués ont été utilisés, il faut considérer le facteur de dilution

Exemple de droite de calibration:



- * **Données spécifiques du lot**
Consulter la rapport du contrôle de qualité.
- * **Critères de validité**
 - * La DO moyenne du Calibrateur 0 U/L doit être < 0,400.
 - L'activité du Contrôle doit être dans les valeurs normales. Consulter la rapport du contrôle de qualité pour la concentration attribuée.
 - * Le coefficient de corrélation (r^2) de la droite de calibration doit être $\geq 0,99$. Refaire la série si les résultats ne rencontrent pas les spécifications!

6.B. INTERPRETATION DES RESULTATS/LIMITATIONS DE LA METHODE

- * Des activités augmentées de TRACP 5 b (voir 7.E.) indiquent une résorption osseuse accrue.
- * Des résultats dans les valeurs normales n'excluent pas complètement des désordres dans le métabolisme osseux. De ce fait, tous les résultats doivent toujours être interprétés en relation avec les données cliniques et les paramètres complémentaires de diagnostic.
- * De hautes concentrations en hémoglobine n'influencent pas les résultats du test.
- * Des hautes concentrations de lipides peuvent réduire les valeurs de DO et fausser l'activité TRACP.

7. CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES

Nous avons déterminé les caractéristiques des performances suivantes pendant l'évaluation de l'essai.

7.A. PRECISION

Echantillon	Variation intra-essai (n = 21)			Echantillon	Variation inter-essai (n = 11)		
	moyenne U/L	SD	CV (%)		moyenne U/L	SD	CV (%)
Contrôle	3,0	0,18	6,0	Contrôle	3,3	0,19	5,8
N° 1	2,6	0,25	9,6	N° 1	2,5	0,23	9,2
N° 2	3,1	0,43	13,9	N° 2	4,2	0,35	8,3
N° 3	7,1	0,47	6,6	N° 3	7,0	0,62	8,9
				N° 4	7,2	0,38	5,4
				N° 5	2,6	0,23	8,8
				N° 6	16,1	1,16	7,2

7.B. RECUPERATION

En ajoutant 3 activités définies de TRACP 5b chacune à 3 différents sera, une ré-coopération moyenne de 100,9 % (SD = 11,3 %) a été déterminée.

7.C. LINEARITE DE LA DILUTION

La linéarité a été déterminée en utilisant des sérums dont l'activité variait (n=5). Les échantillons dont l'activité TRACP 5b est élevée peuvent être dilués jusqu'à 1:5 avec un Diluant d'échantillon.

7.D. LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification est < 0.5 U/L.

7E. VALEURS NORMALES

Les valeurs normales de la TRACP 5b ont été déterminées à partir du sérum de 239 donneurs de sang en bonne santé repartis comme suit :

Groupe	n	Moyenne d'âge (fourchette)	TRACP 5b (U/L) Moyenne $\pm$ SD
Femmes pré-ménopausées en bonne santé	144	39,5 (22 – 54)	2,59 $\pm$ 0,78
Jeunes hommes en bonne santé	32	36,0 (22 – 54)	3,06 $\pm$ 0,88
Femmes post-ménopausées en bonne santé	46	60,3 (41 – 81)	3,19 $\pm$ 0,85
Hommes âgés en bonne santé	17	68,5 (55 – 79)	3,31 $\pm$ 0,72

Les limites hautes des normales ont été déterminées comme étant la moyenne + 2 SD de femmes pré-ménopausées (pour les femmes) ou de jeunes hommes (pour les hommes) :

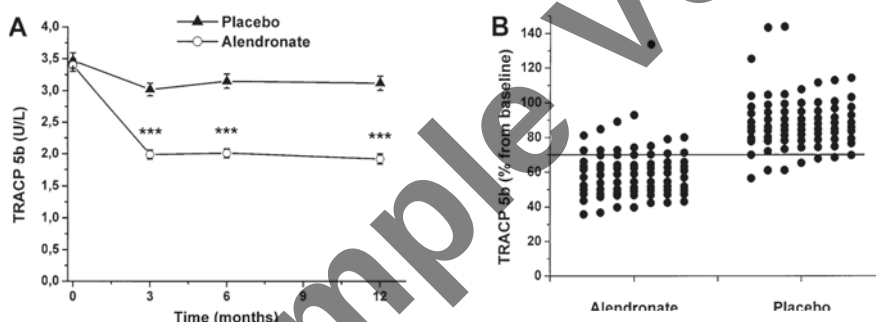
Groupe	Limite haute normale(moyenne + 2SD)
Femmes	4,15 U/L
Hommes	4,82 U/L

8. IMPORTANCE CLINIQUE

L'ACTIVITE DE LA TRACP 5b CHEZ LES FEMMES POST- MENOPAUSEES SOUS UN TRAITEMENT A L'ALENDRONATE

(voir réf. 14)

Les valeurs de la TRACP 5b ont été déterminées à partir du sérum de femmes post-ménopausées recevant 5 mg quotidien d'alendronate pendant 12 mois lors d'une étude avec placebo. Tous les sujets dans les groupes placebo (n = 73) et alendronate (n = 75) recevaient en plus un supplément journalier de 630 mg de calcium carbonate ainsi que 200 IU de vitamine D



A) L'activité TRACP 5b sérique (U/L) avant le commencement du traitement (0) et après 3, 6 et 12 mois; B) Le changement de la TRACP 5b sérique après 3 mois. Chaque point désigne la valeur d'un individu à 3 mois par rapport à la valeur du même individu avant le début du traitement. La ligne dans B) montre le « Least Significant Change » (LSC = 29,5%). Une diminution de plus du LSC a été observée pour 82,7% des sujets du groupe alendronate contre 11,0% des sujets du groupe placebo.

INDICATIONS GENERALES DE MANIPULATION

- * Ne pas échanger les flacons et leurs bouchons pour éviter les contaminations croisées.
- * Les flacons de réactifs doivent être refermés immédiatement après leur utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- * Après emploi, les réactifs doivent être conservés comme indiqué pour garantir leur durée de vie.
- * Après leur utilisation, conserver tous les composants de la trousse dans leur emballage d'origine, afin d'éviter le mélange des réactifs concernant d'autres techniques de dosage ou d'autres lots (voir aussi 3.).

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- * Il faut appliquer la réglementation locale en matière de sécurité et de santé.
- * Les réactifs d'origine animale (voir contenu de la trousse) doivent être manipulés comme potentiellement infectieux et utilisés avec toutes les précautions nécessaires.

Classification (CLP):

Acute Tox. 4

Aquatic Chronic 3

EUH032

Mentions de danger:

EUH032: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

H302: Nocif en cas d'ingestion.

H412: Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Conseils de prudence:

P264: Se laver les mains soigneusement après manipulation.

P270: Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit.

P273: Éviter le rejet dans l'environnement.

P301+310: EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P330: Rincer la bouche.

P501: Éliminer le contenu/récipient dans un centre de collecte des déchets dangereux ou spéciaux.

Le Tampon de Lavage, le Diluant Echantillon, le Réactif de Dissociation et le Tampon de Substrat contiennent du Germall®II (diazolidinyl urea): peut provoquer une réaction allergique.

CONSEIL D'EVACUATION

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets doit se faire selon la réglementation en vigueur. Il faut consulter les organismes agréés pour connaître le moyen de se débarrasser des déchets dangereux

Références

1. Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, Martin AW, Yam LT 1995 Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol* 104:397-402.
2. Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ 1981 Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem* 14:177-181.
3. Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, Halleen JM, Hentunen T, Yam LT 2002 Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 320:49-58.
4. 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.
5. Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari AA, Eastell R, Blumsohn A 2004 Clinical performance of immunoreactive tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34:187-194.
6. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK 2000 Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:1337-1345.
7. 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.
8. Albertini B, Casez JP, Cheneval JP, Wauters JP, Jaeger PH 2002 Low levels of 25-hydroxy-vitamin D3 (25OHD) and high serum tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) activity in hemodialysis patients: relationship to secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 13:571A-572A.
9. Halleen JM 2003 Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption (Review). *Anticancer Res* 23(2A):1027-1029.
10. Chu P, Chao TY, Lin YF, Janckila AJ, Yam LT 2003 Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 41:1052-1059.
11. Reichel H, Esser A, Roth HJ, Schmidt-Gayk H 2003 Influence of PTH Assay Methodology on Differential Diagnosis of Renal Bone Disease. *Nephrol Dial Transplant* 18:759-768.
12. Mehlhorn AT, Rechl H, Stemberger AW, Gradinger R 2002 Immunological and histochemical determination of TRAP 5b to measure osteoclast activity under antiosteolytic treatment. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P21.
13. Stepan JJ, Burckhardt P 2002 Serum activity of type 5b ACP and biochemical markers of type I collagen degradation in osteoporotic men with Klinefelter's syndrome treated with an intravenous ibandronate. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P79.
14. Halleen JM, Nenonen AM, Alatalo SL, Ivaska KK, Cheng S, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Väänänen HK 2003 Comparison of serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b with other markers of bone turnover in monitoring alendronate therapy. *J Bone Miner Res* 18(Suppl.1), Abstract SA104.
15. Rissanen JP, Hentunen TA, Halleen JM 2003 Development and characterization of a novel human in vitro bone resorption assay useful for preclinical testing of drug candidates. *J Bone Miner Res* 18(suppl.1), Abstract SA256.
16. Terpos T, Viniou N, de la Fuente J, Meletis J, Voskaridou E, Karkantaris C, Vaiopoulos G, Palermos J, Yataganas X, Goldman J, Rahemtulla 2003 Pamidronate is superior to ibandronate in decreasing bone resorption, interleukin-6 and beta 2-microglobulin in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 70:34-42.
17. Truniger R, Popp AWE, Perrelet R, Noesberger A, Lippuner K 2003 Effects of a 12 months risedronate treatment on biochemical markers of bone turnover and on serum osteoprotegerin and soluble receptor activator of NF-kB ligand in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 18(suppl. 1), Abstract SU341.
18. Voskaridou E, Terpos E, Spina G, Palmeros J, Rahemtulla A, Loutradi A, Loukopoulos D 2003 Pamidronate is an effective treatment for osteoporosis in patients with beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 1234:730-737.
19. Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK 2000 Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46:1751-1754.

SB-TR201A
Version 09
03 juin 2015

	GB <i>Use By</i> DE <i>Verwendbar bis</i> ES <i>Fecha de caducidad</i> IT <i>Utilizzare entro</i> FR <i>Utiliser jusque</i> NL <i>Houdbaar tot</i> DK <i>Holdbar til</i> CZ <i>Použitelné do</i> SK <i>Použitelné do</i> GR <i>Ημερομηνία λήξης</i> PT <i>Prazo de validade</i> HU <i>Felhasználható</i> SE <i>Använd före</i> PL <i>Użyć przed</i>	LOT	GB <i>Batch code</i> DE <i>Chargenbezeichnung</i> ES <i>Código de lote</i> IT <i>Codice del lotto</i> FR <i>Code du lot</i> NL <i>Lot nummer</i> DK <i>Lotnummer</i> CZ <i>Číslo šarže</i> SK <i>Číslo šarže</i> GR <i>Αριθμός Παρτίδας</i> PT <i>Código do lote</i> HU <i>Sarzsorszám</i> SE <i>Lot nummer</i> PL <i>Kod partii</i>
REF	GB <i>Catalogue number</i> DE <i>Bestellnummer</i> ES <i>Número de catálogo</i> IT <i>Numero di catalogo</i> FR <i>Référence du catalogue</i> NL <i>Catalogus nummer</i> DK <i>Katalognummer</i> CZ <i>Katalogové číslo</i> SK <i>Katalogové číslo</i> GR <i>Αριθμός καταλόγου</i> PT <i>Referência de catálogo</i> HU <i>Katalógusszám</i> SE <i>Katalognummer</i> PL <i>Numer katalogowy</i>		GB <i>Manufacturer</i> DE <i>Hersteller</i> ES <i>Fabricante</i> IT <i>Fabbricante</i> FR <i>Fabricant</i> NL <i>Fabrikant</i> DK <i>Producent</i> CZ <i>Výrobce</i> SK <i>Výrobca</i> GR <i>Κατασκευαστής</i> PT <i>Fabricante</i> HU <i>Gyártó</i> SE <i>Tillverkare</i> PL <i>Producent</i>
	GB <i>Contains sufficient for <n> tests</i> DE <i>Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen</i> ES <i>Contenido suficiente para <n> ensayos</i> IT <i>Contenuto sufficiente per "n" saggi</i> FR <i>Contenu suffisant pour "n" tests</i> NL <i>Inhoud voldoende voor "n" testen</i> DK <i>Indeholder tilstrækkeligt til "n" test</i> CZ <i>Lze použít pro <n> testů</i> SK <i>Obsah postačuje na <n> stanovení</i> GR <i>Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις</i> PT <i>Conteúdo suficiente para "n" ensaios</i> HU <i>A doboz tartalma <n> vizsgálat elvégzéséhez elegendő</i> SE <i>Räcker till "n" antal tester</i> PL <i>Wystarczy na wykonanie <n> testów</i>	IVD	GB <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i> DE <i>In-Vitro-Diagnostikum</i> ES <i>Producto sanitario para diagnóstico in vitro</i> IT <i>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</i> FR <i>Dispositif médical de diagnostic in vitro</i> NL <i>Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek</i> DK <i>Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik</i> CZ <i>In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek</i> SK <i>Zdravotnícka pomocka in vitro</i> GR <i>In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν</i> PT <i>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro</i> HU <i>In vitro diagnosztikum</i> SE <i>Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik</i> PL <i>Wyrob do diagnostyki In Vitro</i>
	GB <i>Temperature limitation</i> DE <i>Temperaturbegrenzung</i> ES <i>Límite de temperatura</i> IT <i>Limiti di temperatura</i> FR <i>Limites de température</i> NL <i>Temperatuurlimiet</i> DK <i>Temperaturbegrænsning</i> CZ <i>Teplotní rozmezí od do</i> SK <i>Teplotné rozmedzie od do</i> GR <i>Περιορισμοί θερμοκρασίας</i> PT <i>Limites de temperatura</i> HU <i>Hőmérséklettartomány</i> SE <i>Temperaturbegränsning</i> PL <i>Przestrzegać zakresu temperatury</i>		GB <i>Consult Instructions for Use</i> DE <i>Gebrauchsanweisung beachten</i> ES <i>Consulte las instrucciones de uso</i> IT <i>Consultare le istruzioni per l'uso</i> FR <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> NL <i>Raadpleeg de gebruiksaanwijzing</i> DK <i>Se brugsanvisning</i> CZ <i>Viz návod k použití</i> SK <i>Vid' návod na použitie</i> GR <i>Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης</i> PT <i>Consulte as instruções de utilização</i> HU <i>Nézze meg a Használati utasítást</i> SE <i>Se handhavandebeskrivningen</i> PL <i>Sprawdź w instrukcji obsługi</i>

	GB	<i>EU Importer</i>
	DE	<i>EU-Importeur</i>
	ES	<i>UE Importador</i>
	IT	<i>Importatore UE</i>
	FR	<i>Importateur UE</i>



Immunodiagnostic Systems Limited,
 10 Didcot Way, Boldon Business Park,
 Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
 Tel.: +44 191 519 0660
 Fax: +44 191 519 0760
 E-Mail: info.uk@idsplc.com



IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
 Herriotstrasse 1
 60528 Frankfurt am Main
 Germany

• www.idsplc.com

BoneTRAP® (TRAcP 5b) ELISA

Test zur quantitativen Bestimmung der aktiven Isoform 5b
der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRACP)

Katalog-Nr.: SB-TR201A

Zur *in vitro* Diagnostik.

EINFÜHRUNG

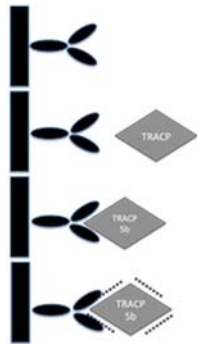
Große Mengen der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRACP) werden von knochen-resorbierenden Osteoklasten und aktivierten Makrophagen exprimiert (1). Im menschlichen Blut zirkulieren zwei Formen der TRACP, definiert als TRACP 5a und TRACP 5b (2). Die TRACP 5b stammt von Osteoklasten, die TRACP 5a von Makrophagen (3).

Osteoklasten sezernieren TRAP 5b in die Blutzirkulation als aktives Enzym, welches vor der Eliminierung inaktiviert und zu Fragmenten abgebaut wird. Dadurch akkumuliert die TRACP 5b-Aktivität bei renalen oder hepatischen Erkrankungen nicht in der Zirkulation (4,5). Die tagesrhythmische Variabilität der Serum-TRACP 5b-Aktivität ist gering, und die Werte werden durch den Ernährungsstatus nicht beeinflusst, was eine tageszeitlich uneingeschränkte Probenentnahme ermöglicht (5).

Der BoneTRAP®-Assay ist eine spezifische Methode zur Bestimmung der unmittelbar von den Osteoklasten freigesetzten TRACP 5b-Aktivität. Sie dient der Ermittlung einer erhöhten Knochenresorptionsrate bei Patienten mit primärer Osteoporose und renal bedingter Knochenerkrankung (4,6-11). Der BoneTRAP®-Assay ist gut geeignet zum Monitoring der Effizienz antiresorptiver Therapien (6,9, 12-18). *In vitro* reflektiert die Medium-TRACP 5b-Aktivität die Anzahl der Osteoklasten (15, 19), und daher ist der BoneTRAP® Assay gut geeignet zur Bestimmung der Osteoklastenzahl in humanen Osteoklastenkulturen.

Example Version

TESTPRINZIP



Mit monoklonalem Anti-TRACP-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte.

Zugabe von TRACP-Standards, Kontrolle und Patientenproben.

Zugabe von Freisetzungsreagenz. Dissoziation der aktiven TRACP 5b von den Bindungsproteinen.

Bindung von TRACP 5b an den Anti-TRACP- Antikörper.

Inkubation mit pNPP-Substrat (*).

Stoppen der Enzym-Substrat
Reaktion mit NaOH. Die Auswertung erfolgt photo- metrisch.

- ◆ Testvorteile
- ◆ Messung der TRACP 5b-Aktivität, die spezifisch von den Osteoklasten freigesetzt wird.
- ◆ Keine Interferenz mit TRACP 5a oder anderen Phosphatasen.
- ◆ Keine Beeinflussung der Ergebnisse durch Hämolyse.
- ◆ Keine tagesrhythmischen Schwankungen.
- ◆ Keine Beeinträchtigung durch Leber- bzw. Nierenfunktionsstörungen.
- ◆ Keine ernährungsbedingten Einflüsse.

PACKUNGSIHALT

KAT.-NR.: SB-TR201A

1. **MICROPLAT** Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel), Flachboden, beschichtet mit monoklonalem Anti-TRACP-Antikörper (Maus) und BSA, gebrauchsfertig.
2. **CTRL** Kontrollen: 2 x 2 Fläschchen à 0,5 ml, humane rekombinante TRACP, lyophilisiert, Xn, Gesundheitsschädlich, R 22-52/53, S 36-60, enthält < 1 % Natriumazid und BSA.
3. **CAL** Standards: je 2 x 6 Fläschchen à 0,5 ml, humane rekombinante TRACP, lyophilisiert, Xn, Gesundheitsschädlich, R 22-52/53, S 36-60, enthält < 1 % Natriumazid und BSA. Für jeden Standard ist der exakte Wert auf den Qualitätskontrollbericht angegeben.
4. **WASHBUF 25x** Waschpuffer: 1 Flasche à 40 ml, TBS/Tween (25x conc.), pH 7,65 – 7,85, enthält < 1% Germall®II.
5. **SAMPDIL** Probenverdünnungspuffer: 1 Fläschchen à 15 ml, Natriumchlorid- lösung, gebrauchsfertig, enthält < 1 % Germall®II.
6. **RELEASEAG** Freisetzungsreagenz: 1 Fläschchen à 8 ml, pH 6,9 – 7,1, gebrauchsfertig, enthält < 1 % Germall®II.
7. **SUBSBUF** Substratpuffer: 2 Fläschchen à 10 ml, Natriumacetatpuffer, pH 5,95 – 6,05, gebrauchsfertig, enthält < 1 % Germall®II.
8. **SUBS pNPP** Substrattabletten: 4 Tabletten, enthalten p-Nitrophenylphosphat (pNPP).
9. **NaOH** Stopplösung: 1 Fläschchen à 6 ml, 0,32 M Natriumhydroxid, gebrauchsfertig, Xi, Reizend, R 36/38, S 26-37-60.

1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

MATERIAL/REAGENZ	ZUSTAND	LAGERUNG	HALTBARKEIT
Testkit	ungeöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Kontrolle	rekonstituiert	-18 °C oder darunter	6 Wochen
Standards	rekonstituiert	-18 °C oder darunter	6 Wochen
Substratpuffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Waschpuffer	gebrauchsfertig	2...8 °C	6 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Freisetzungsreagenz	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen

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

Die oben genannten Informationen zur Probenlagerung und Probenstabilität sind allgemeine Empfehlungen für die Verwendung in verschiedenen Laborumgebungen. Jedes Labor muss die Richtlinien bzw. Anforderungen der geltenden lokalen, staatlichen und/oder bundesstaatlichen Bestimmungen oder Akkreditierungsstellen beachten, um ein eigenes Verfahren für den Umgang mit Probenmaterial und Lagerstabilität zu erreichen. Informationen zu angemessenen Praktiken sind in folgender Richtlinie enthalten: CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- 2.1. Entionisiertes Wasser.
- 2.2. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.3. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben und zum Ansetzen der Substratlösung.
- 2.4. Geeignete Vorrichtung zum Waschen der Mikrotiterplatte (z. B. Multistepper oder ELISA-Waschgerät).
- 2.5. Inkubator für 37 °C.
- 2.6. Mikrotiterplattenschüttler, Schüttelfrequenz 850–950 rpm, Amplitude 4 mm.
- 2.7. Mikrotiterplatten-Photometer mit Filter für 405 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 muß nach jeder Entnahme zusammen mit dem Trockenmittel wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen s. Tabelle 1.
- 3.2. Waschpuffer
1 Teil Waschpuffer (25x) wird mit 24 Teilen Aqua ad iniectionem angesetzt (z. B. 10 ml Waschpuffer (25x) mit 240 ml Aqua ad iniectionem). Für 8 Vertiefungen werden 7 ml Waschpuffer benötigt.
- 3.3. Standards
Rekonstitution mit je 0,5 ml Aqua ad iniectionem, Rekonstitutionszeit 15 min.
- 3.4. Kontrollen
Rekonstitution mit 0,5 ml Aqua ad iniectionem, Rekonstitutionszeit 15 min.
- 3.5. Substratlösung
1 Substrattablette in 5 ml Substratpuffer lösen. Die Substratlösung ist nicht lagerfähig!

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 für Serum und EDTA-Plasma.

Anmerkung: Bei Follow up-Untersuchungen ist immer derselbe Probentyp zu verwenden.

- 4.2. Eine Vorbehandlung der Seren, wie z. B. Inaktivierung, darf nicht erfolgen. Die Seren sollten nicht mikrobiell kontaminiert sein
- 4.3. Die Seren können bis zu 8 Stunden bei Raumtemperatur und bis zu 3 Tage bei 2-8 °C gelagert werden. Bis zu 2 Monate können die Seren bei -20 °C gelagert werden. Für eine Langzeitaufbewahrung wird eine Lagerung bei -80 °C empfohlen.
- 4.4. Die Seren werden initial unverdünnt eingesetzt. Proben außerhalb des Meßbereiches können bis 1:5 mit Probenverdünnungspuffer weiterverdünnt und erneut bestimmt werden.

5.A. ARBEITSVORSCHRIFT

- 5.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s. 3.1.).

Die Mikrotitervertiefungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht vorgewaschen werden.

- 5.2. Jeweils 100 µl der Standards, der Kontrollen und der Proben in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Platte pipettieren.
- 5.3. Jeweils 50 µl Freisetzungsreagenz in jede Mikrotitervertiefung pipettieren.
- 5.4. Die Mikrotitervertiefungen werden mit Folie abgeklebt und 60 min (± 5 min) bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln mit 850-950 rpm inkubiert.
- 5.5. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen viermal mit jeweils 300 µl Waschpuffer waschen. Darauf achten, daß alle Vertiefungen beim Waschen gefüllt sind. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!

- 5.6. 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren.
- 5.7. Die Mikrotitervertiefungen mit Folie abkleben und 60 min (± 5 min) bei 37 °C (± 1 °C) inkubieren.
- 5.8. Durch Zugabe von 25 µl Stopplösung in jede Vertiefung wird die Reaktion gestoppt.

Vor dem Messen ist durch vorsichtiges Schütteln für gleichmäßige Durchmischung zu sorgen.

Mikrotitervertiefungen vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, daß keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind!

Die Messung ist innerhalb von 15 Minuten nach dem Stoppen bei 405 nm durchzuführen.

5.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Standards	Kontrolle	Probe
Standards	- 100 µl	-	-
Kontrollen	-	100 µl	-
Probe	-	-	100 µl
Freisetzungsreagenz	I 50 µl	50 µl	50 µl
60 min (± 5 min) bei Raumtemperatur unter Schütteln (850-950 rpm) inkubieren, 4 x mit 300 µl Waschpuffer waschen			
Substratlösung	100 µl	100 µl	100 µl
60 min (± 5 min) bei 37 °C (± 1 °C) inkubieren			
Stopplösung	25 µl	25 µl	25 µl
Photometrische Auswertung bei 405 nm			

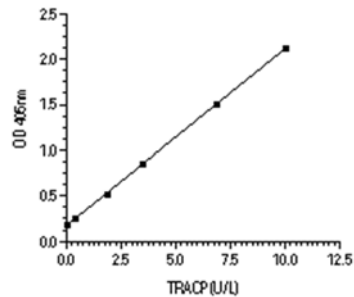
6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- * Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 405 nm.
 - * Die OD-Mittelwerte aller Standards werden berechnet und gegen die Aktivität aufgetragen. Die Kalibrationsgerade wird mittels linearer Regression errechnet.
 - * Der Messbereich erstreckt sich von 0,5 U/L – 10 U/L. Proben mit Aktivitäten unterhalb des
- SB-TR201A v10DRAFT xx Deutsch Seite 4 / 9 Katalog-Nr.: SB-TR201A

Messbereichs sind als < 0,5 U/L zu bewerten. Aktivitäten oberhalb des Messbereichs sind als > 10 U/L zu bewerten. Diese dürfen nicht extrapoliert werden, sondern die Proben sollten verdünnt nachgetestet werden.

- * Die TRACP 5b-Aktivitäten der Kontrollen und der Proben werden über die Regressionsgerade ermittelt. Wurden die Proben verdünnt eingesetzt, ist der Probenverdünnungsfaktor bei der Berechnung zu berücksichtigen.

Beispiel einer Standardkurve



* **Chargenspezifische Daten**

Siehe Qualitätskontrollbericht.

* **Validitätskriterien**

- Der OD-Mittelwert des 0 U/L-Standards muß < 0,400 betragen.
- Der Unit-Wert der Kontrolle muß innerhalb des Sollwertbereiches liegen. Sollwertbereiches, siehe Qualitätskontrollbericht.
- Der Korrelationskoeffizient (r^2) der Regressionsgeraden muß $\geq 0,99$ betragen.

Sind die oben genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden!

6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE

- * Erhöhte TRACP 5b-Aktivitäten (vgl. 7.E.) deuten auf eine erhöhte Knochenresorption hin.
- * Werte innerhalb des Normalbereiches schließen Störungen im Knochenstoffwechsel nicht vollständig aus. Daher müssen alle Testergebnisse stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild des Patienten und weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.
- * Hohe Hämoglobinkonzentrationen beeinflussen die Testergebnisse nicht.
- * Hohe Lipidkonzentrationen können zu niedrigeren OD-Werten führen, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der Testvalidierung ermittelt.

7.A PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz (n = 21)			Probe	Interassay-Varianz (n = 11)		
	Mw U/L	S	VK (%)		Mw U/L	S	VK (%)
Kontrolle	3,0	0,18	6,0	Kontrolle	3,3	0,19	5,8
Nr. 1	2,6	0,25	9,6	Nr. 1	2,5	0,23	9,2
Nr. 2	3,1	0,43	13,9	Nr. 2	4,2	0,35	8,3
Nr. 3	7,1	0,47	6,6	Nr. 3	7,0	0,62	8,9
				Nr. 4	7,2	0,38	5,4
				Nr. 5	2,6	0,23	8,8
				Nr. 6	16,1	1,16	7,2

7.B. WIEDERFINDUNG

Durch Zugabe von jeweils drei definierten TRACP 5b-Aktivitäten zu drei verschiedenen Seren wurde eine mittlere Wiederfindung von 100,9 % (S = 11,3 %) ermittelt.

7.C. VERDÜNNUNGSLINEARITÄT

Durch die Verwendung von Seren verschiedenen Aktivitätsgrades (n=5) war eine Linearität determiniert. Samples mit hoher TRACP 5b Aktivität können mit einem Sample-Verdünner bis auf ein Verhältnis von 1:5 verdünnt werden.

7.D. BESTIMMUNGSGRENZE

Die Bestimmungsgrenze beträgt $< 0,5$ U/L.

7.E. REFERENZBEREICHE

Die Referenzbereiche für TRACP 5b wurden durch Messung von 239 Seren gesunder Blutspender wie folgt ermittelt:

Gruppe	n	Mittleres Alter (Verteilung)	TRACP 5b (U/L) Mw $\pm$ S
Prämenopausale Frauen	144	39,5 (22 – 54)	2,59 $\pm$ 0,78
Junge Männer	32	36,0 (22 – 54)	3,06 $\pm$ 0,88
Postmenopausale Frauen	46	60,3 (41 – 81)	3,19 $\pm$ 0,85
Alte Männer	17	68,5 (55 – 79)	3,31 $\pm$ 0,72

Die oberen Grenzen der Normbereiche wurden berechnet als die Mittelwerte + 2S für prämenopausale Frauen bzw. für junge Männer:

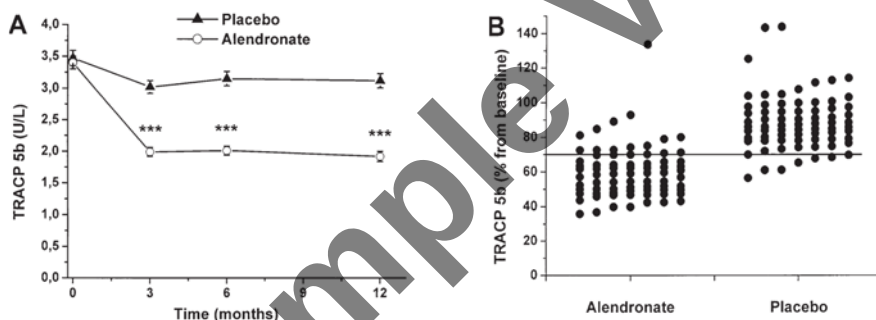
Gruppe	Obere Grenze des Normbereiches (Mw + 2S)
Frauen	4,15 U/L
Männer	4,82 U/L

8. KLINISCHE BEDEUTUNG

TRACP 5B-AKTIVITÄT BEI POSTMENOPAUSALEN FRAUEN UNTER ALENDRONAT-THERAPIE

(s. Ref. 14)

Die TRACP 5b-Werte wurden in Seren von postmenopausalen Frauen unter täglicher Gabe von 5 mg Alendronat über einen Zeitraum von 12 Monaten bestimmt. Die Untersuchung war Placebo-kontrolliert. Sowohl die Probanden in der Placebo-(n = 73) als auch die in der Alendronat-Gruppe (n = 75) erhielten zusätzlich täglich 630 mg Calciumcarbonat und 200 IU Vitamin D.



A) Serum-TRACP 5b-Aktivität (U/L) vor Beginn der Behandlung (0) und nach 3, 6 und 12 Monaten; B) Veränderung der Serum-TRACP 5b nach 3 Monaten. Jeder Punkt repräsentiert den Wert eines Probanden nach 3 Monaten verglichen mit demselben individuellen Basiswert (vor Beginn der Behandlung). Die Gerade in B) markiert die minimal signifikante Abweichung (least significant change; LSC = 29,5%). Ein Abfall unterhalb des LSC wurde bei 82,7% der Probanden in der Alendronat-Gruppe und bei 11,0% der Probanden in der Placebo-Gruppe beobachtet.

ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE

- * Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- * Sofort nach Gebrauch die Reagenzienflaschen 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 Komponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

SICHERHEITSHINWEISE

- * Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- * Reagenzien, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), sollten als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

Einstufung (CLP):

Acute Tox. 4
Aquatic Chronic 3
EUH032

Gefahrenhinweise:

EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Sicherheitshinweise:

P264: Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P270: Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P301+310: BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P330: Mund ausspülen.
P501: Inhalt/Behälter zu einer Problemabfallentsorgung zuführen.

Waschpuffer, Probenverdünnungspuffer, Freisetzungsreagenz und Substratpuffer enthalten Germall®II (Diazolidinylharnstoff): Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

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.

Example Version

Literatur

1. Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, Martin AW, Yam LT 1995 Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol* 104:397-402.
2. Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ 1981 Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem* 14:177-181.
3. Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, Halleen JM, Hentunen T, Yam LT 2002 Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 320:49-58.
4. 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.
5. Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari AA, Eastell R, Blumsohn A 2004 Clinical performance of immunoreactive tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34:187-194.
6. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK 2000 Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:1337-1345.
7. 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.
8. Albertini B, Casez JP, Cheneval JP, Wauters JP, Jaeger PH 2002 Low levels of 25-hydroxy-vitamin D3 (25OHD) and high serum tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) activity in hemodialysis patients: relationship to secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 13:571A-572A.
9. Halleen JM 2003 Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption (Review). *Anticancer Res* 23(2A):1027-1029.
10. Chu P, Chao TY, Lin YF, Janckila AJ, Yam LT 2003 Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 41:1052-1059.
11. Reichel H, Esser A, Roth HJ, Schmidt-Gayk H 2003 Influence of PTH Assay Methodology on Differential Diagnosis of Renal Bone Disease. *Nephrol Dial Transplant* 18:759-768.
12. Mehlhorn AT, Rechl H, Stemberger AW, Gradinger R 2002 Immunological and histochemical determination of TRAP 5b to measure osteoclast activity under antiosteolytic treatment. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P21.
13. Stepan JJ, Burckhardt P 2002 Serum activity of type 5b ACP and biochemical markers of type I collagen degradation in osteoporotic men with Klinefelter's syndrome treated with an intravenous ibandronate. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P79.
14. Halleen JM, Nenonen AM, Alatalo SL, Ivaska KK, Cheng S, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Väänänen HK 2003 Comparison of serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b with other markers of bone turnover in monitoring alendronate therapy. *J Bone Miner Res* 18(Suppl.1), Abstract SA104.
15. Rissanen JP, Hentunen TA, Halleen JM 2003 Development and characterization of a novel human in vitro bone resorption assay useful for preclinical testing of drug candidates. *J Bone Miner Res* 18(suppl.1), Abstract SA256.
16. Terpos T, Viniou N, de la Fuente J, Meletis J, Voskaridou E, Karkantaris C, Vaiopoulos G, Palermos J, Yataganas X, Goldman J, Rahemtulla 2003 Pamidronate is superior to ibandronate in decreasing bone resorption, interleukin-6 and beta 2-microglobulin in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 70:34-42.
17. Truniger R, Popp AWE, Perrelet R, Noesberger A, Lippuner K 2003 Effects of a 12 months risedronate treatment on biochemical markers of bone turnover and on serum osteoprotegerin and soluble receptor activator of NF-kB ligand in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 18(suppl. 1), Abstract SU341.
18. Voskaridou E, Terpos E, Spina G, Palmeros J, Rahemtulla A, Loutradi A, Loukopoulos D 2003 Pamidronate is an effective treatment for osteoporosis in patients with beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 1234:730-737.
19. Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK 2000 Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46:1751-1754.

SB-TR201A

Version 09

03 Juni 2015

	GB <i>Use By</i> DE <i>Verwendbar bis</i> ES <i>Fecha de caducidad</i> IT <i>Utilizzare entro</i> FR <i>Utiliser jusque</i> NL <i>Houdbaar tot</i> DK <i>Holdbar til</i> CZ <i>Použitelné do</i> SK <i>Použitelné do</i> GR <i>Ημερομηνία λήξης</i> PT <i>Prazo de validade</i> HU <i>Felhasználható</i> SE <i>Använd före</i> PL <i>Użyć przed</i>	LOT	GB <i>Batch code</i> DE <i>Chargenbezeichnung</i> ES <i>Código de lote</i> IT <i>Codice del lotto</i> FR <i>Code du lot</i> NL <i>Lot nummer</i> DK <i>Lotnummer</i> CZ <i>Číslo šarže</i> SK <i>Číslo šarže</i> GR <i>Αριθμός Παρτίδας</i> PT <i>Código do lote</i> HU <i>Sarzszzám</i> SE <i>Lot nummer</i> PL <i>Kod partii</i>
REF	GB <i>Catalogue number</i> DE <i>Bestellnummer</i> ES <i>Número de catálogo</i> IT <i>Numero di catalogo</i> FR <i>Référence du catalogue</i> NL <i>Catalogus nummer</i> DK <i>Katalognummer</i> CZ <i>Katalogové číslo</i> SK <i>Katalogové číslo</i> GR <i>Αριθμός καταλόγου</i> PT <i>Referência de catálogo</i> HU <i>Katalógusszám</i> SE <i>Katalognummer</i> PL <i>Numer katalogowy</i>		GB <i>Manufacturer</i> DE <i>Hersteller</i> ES <i>Fabricante</i> IT <i>Fabbricante</i> FR <i>Fabricant</i> NL <i>Fabrikant</i> DK <i>Producent</i> CZ <i>Výrobce</i> SK <i>Výrobca</i> GR <i>Κατασκευαστής</i> PT <i>Fabricante</i> HU <i>Gyártó</i> SE <i>Tillverkare</i> PL <i>Producent</i>
	GB <i>Contains sufficient for <n> tests</i> DE <i>Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen</i> ES <i>Contenido suficiente para <n> ensayos</i> IT <i>Contenuto sufficiente per "n" saggi</i> FR <i>Contenu suffisant pour "n" tests</i> NL <i>Inhoud voldoende voor "n" testen</i> DK <i>Indeholder tilstrækkeligt til "n" test</i> CZ <i>Lze použít pro <n> testů</i> SK <i>Obsah postačuje na <n> stanovení</i> GR <i>Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις</i> PT <i>Conteúdo suficiente para "n" ensaios</i> HU <i>A doboz tartalma <n> vizsgálat elvégzéséhez elegendő</i> SE <i>Räcker till "n" antal tester</i> PL <i>Wystarczy na wykonanie <n> testów</i>	IVD	GB <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i> DE <i>In-Vitro-Diagnostikum</i> ES <i>Producto sanitario para diagnóstico in vitro</i> IT <i>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</i> FR <i>Dispositif médical de diagnostic in vitro</i> NL <i>Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek</i> DK <i>Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik</i> CZ <i>In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek</i> SK <i>Zdravotnícka pomocka in vitro</i> GR <i>In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν</i> PT <i>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro</i> HU <i>In vitro diagnosztikum</i> SE <i>Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik</i> PL <i>Wyrób do diagnostyki In Vitro</i>
	GB <i>Temperature limitation</i> DE <i>Temperaturbegrenzung</i> ES <i>Límite de temperatura</i> IT <i>Limiti di temperatura</i> FR <i>Limites de température</i> NL <i>Temperatuurlimiet</i> DK <i>Temperaturbegrænsning</i> CZ <i>Teplotní rozmezí od do</i> SK <i>Teplotné rozmedzie od do</i> GR <i>Περιορισμοί θερμοκρασίας</i> PT <i>Limites de temperatura</i> HU <i>Hőmérséklettartomány</i> SE <i>Temperaturbegränsning</i> PL <i>Przestrzegać zakresu temperatury</i>		GB <i>Consult Instructions for Use</i> DE <i>Gebrauchsanweisung beachten</i> ES <i>Consulte las instrucciones de uso</i> IT <i>Consultare le istruzioni per l'uso</i> FR <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> NL <i>Raadpleeg de gebruiksaanwijzing</i> DK <i>Se brugsanvisning</i> CZ <i>Viz návod k použití</i> SK <i>Vid' návod na použitie</i> GR <i>Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης</i> PT <i>Consulte as instruções de utilização</i> HU <i>Nézze meg a Használati utasítást</i> SE <i>Se handhavandebeskrivningen</i> PL <i>Sprawdź w instrukcji obsługi</i>

	GB	<i>EU Importer</i>
	DE	<i>EU-Importeur</i>
	ES	<i>UE Importador</i>
	IT	<i>Importatore UE</i>
	FR	<i>Importateur UE</i>



Immunodiagnostic Systems Limited,
 10 Didcot Way, Boldon Business Park,
 Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
 Tel.: +44 191 519 0660
 Fax: +44 191 519 0760
 E-Mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com



IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
 Herriotstrasse 1
 60528 Frankfurt am Main
 Germany

BoneTRAP® (TRACP 5b) ELISA

Metodo per la determinazione quantitativa dell'isoforma attiva 5b della fosfatasi acida tartrato - resistente (TRACP)

Cat. no.: SB-TR201A

Solo per uso diagnostico in vitro

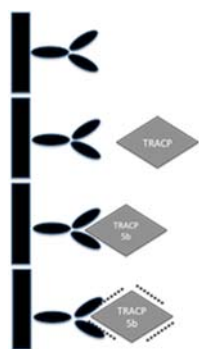
Introduzione

Gli osteoclasti che riassorbono il tessuto osseo e i macrofagi attivati esprimono livelli elevati di fosfatasi acida tartrato-resistente (1). In circolo sono presenti due isoforme di questa fosfatasi TRACP 5a e TRACP 5b (2) secrete rispettivamente da macrofagi e osteoclasti (3).

Gli osteoclasti secernono in circolo la TRACP 5b come enzima attivo che viene inattivato e degradato in frammenti prima di essere rimosso dal sangue. Per questo motivo l'attività enzimatica TRACP 5b non aumenta nell'insufficienza renale o epatica (4,5). Tutto l'enzima è prodotto dagli osteoclasti. Non è presente variabilità circadiana e i livelli enzimatici non sono influenzati dalla dieta; è quindi possibile raccogliere i campioni di sangue in qualsiasi ora del giorno(5).

Il dosaggio BoneTRAP® è un metodo specifico per determinare l'attività dell'enzima TRACP 5b liberato dagli osteoclasti. Il dosaggio è indicato come marcatore del riassorbimento osseo e per il monitoraggio delle variazioni del riassorbimento in donne in post menopausa e in pazienti con diagnosi di osteoporosi sottoposte a terapia anti riassorbimento osseo (terapia ormonale sostitutiva, HRT, o bifosfonati) (4, 6-18). L'attività dell'enzima TRACP 5b in vitro è correlata al numero di osteoclasti (15,19); è possibile quindi utilizzare il dosaggio BoneTRAP® per determinare il numero di osteoclasti nelle colture di osteoclasti umani.

Principio del metodo



La micropiastre è sensibilizzata con anticorpi monoclonali anti TRACP.

Si dispensano standard, controlli e campioni.

Si aggiunge un dissociante che stacca il TRACP 5b dalle proteine leganti.

Il TRACP 5b viene legato dagli anticorpi anti TRACP.

Incubazione con il substrato pNPP (*).

WASHBUF 25X

La reazione viene bloccata con l'aggiunta di idrossido di sodio. Si legge l'assorbanza con un lettore di micropiastre.

Caratteristiche del metodo

- u Misura l'attività del TRACP 5b liberato in modo specifico dagli osteoclasti.
- u Nessuna interferenza da parte di TRACP 5a o di altre fosfatasi.
- u L'emolisi non ha nessuna influenza sui risultati.
- u Nessuna variazione circadiana.
- u Il dosaggio non è influenzato da malattie epatiche o renali.
- u Nessuna influenza della dieta.

CONTENUTO DEL KIT

Cat. no.: SB-TR201A

1. **MICROPLAT** Micropiastre: 12 x 8 pozzetti (in un telaio con dissecante in una busta di alluminio), con fondo a U, sensibilizzate con anticorpo monoclonale da topo anti TRACP con BSA, pronta per l'uso.
2. **CTRL** Controlli: 2 x 2 flaconi da 0,5 mL ciascuno, con TRACP umano ricombinante, liofilizzati, Xn, Nocivo, R 22-52/53, S 36-60, contenenti sodio azide < 1 % e BSA.
3. **CAL** Standard: 2 x 6 flaconi da 0,5 mL ciascuno, con TRACP umano ricombinante, liofilizzati, Xn, Nocivo, R 22-52/53, S 36-60, contenenti sodio azide < 1 % e BSA. La concentrazione esatta degli standard è riportata sul rapporto del controllo di qualità.
4. **WASHBUF 25X** Tampone di lavaggio: 1 flacone con 40 mL di TBS/Tween (conc. 25x) pH 7,65 – 7,85, contiene Germall®II < 1 %.
5. **SAMPDIL** Diluente per i campioni: 1 flacone con 15 mL di cloruro di sodio in soluzione, pronto per l'uso, contiene Germall®II < 1 %.
6. **RELEASESREAG** Agente dissociante: 1 flacone con 8 mL di soluzione, pH 6,9 – 7,1, pronto per l'uso, contiene Germall®II < 1 %.
7. **SUBSBUF** Tampone per il substrato: 2 flaconi con 10 mL ciascuno di tampone acetato di sodio, pH 5,95 – 6,05, pronto per l'uso, contiene Germall®II < 1 %.
8. **SUBS pNPP** Substrato: 4 pastiglie, contiene p-nitrofenil fosfato (pNPP).
9. **NaOH** Soluzione di stop: 1 flacone con 6 ml di idrossido di sodio 0,32 M, pronto per l'uso, Xi, Irritante, R 36/38, S 26-37-60.

1. CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REATTIVI

MATERIALE/REATTIVO STATO		CONSERVAZIONE	STABILITA'
Kit completo	prima dell'uso	2...8 °C	fino alla data di scadenza
Micropiastra con il dissecante	utilizzata	2...8 °C nella busta	6 settimane
Controlli	ricostituiti	-18 °C o inferiore	6 settimane
Standard	ricostituiti	-18 °C o inferiore	6 settimane
Tampone per il substrato	utilizzato	2...8 °C	6 settimane
Tampone di lavaggio	diluito	2...8 °C	6 settimane
Diluente per i campioni	utilizzato	2...8 °C	6 settimane
Agente dissociante	utilizzato	2...8 °C	6 settimane
Soluzione di stop	utilizzato	2...8 °C	6 settimane

Non usare i reattivi dopo la data di scadenza.

Le suddette informazioni sulla stabilità e sulla conservazione dei campioni sono raccomandazioni generali per l'utilizzo in una vasta gamma di applicazioni di laboratorio. Per definire la propria gestione dei campioni e la stabilità di immagazzinaggio, ogni laboratorio deve attenersi alle linee guida o ai requisiti delle normative regionali, nazionali e/o federali oppure stabiliti da organismi di accreditamento. Per informazioni sulle prassi più appropriate, fare riferimento a CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

2. REATTIVI E MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- 2.1 Acqua deionizzata.
- 2.2 Micropipette a volume variabile.
- 2.3 Vetreria da laboratorio e provette (in vetro o in plastica) per diluire il tampone di lavaggio e i campioni.
- 2.4 Lavatore di micropiastre (manuale o automatico).
- 2.5 Termostato a 37 °C.
- 2.6 Agitatore per micropiastre, agitazione 850–950 rpm, ampiezza dell'agitazione 4 mm.
- 2.7 Lettore di micropiastre con filtro a 405 nm.

3. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

Prima di iniziare il dosaggio portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Calcolare il numero di pozzetti necessario per il dosaggio.

- 3.1 Micropiastra
Richiudere con cura la busta di alluminio con il dissecante dopo aver tolto le strip necessarie per il dosaggio. Le condizioni di conservazione e la stabilità sono indicate nella tabella 1.
- 3.2 Tampone di lavaggio
Aggiungere ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (25x) con 24 volumi di acqua bidistillata (iniettabile) ad es. 10 mL tampone di lavaggio concentrato (25x) con 240 mL volumi di acqua. Per 8 pozzetti sono necessari 7 mL di tampone di lavaggio diluito.
- 3.3 Standard
Ricostituire gli standard liofilizzati con 0,5 mL di acqua bidistillata iniettabile. Attendere 15 minuti prima dell'uso.
- 3.4 Controlli
Ricostituire i controlli liofilizzati con 0,5 mL di acqua bidistillata iniettabile. Attendere 15 minuti prima dell'uso.
- 3.5 Soluzione del substrato
Dissolvere 1 pastiglia di substrato con 5 mL di tampone per il substrato.

Scartare la soluzione del substrato avanzata dopo il dosaggio.

Non utilizzare insieme reattivi di lotti o produttori differenti.

Si possono ottenere risultati corretti e riproducibili solo se si seguono esattamente le istruzioni fornite e si usano i reattivi consigliati per il dosaggio.

4. CAMPIONI

4.1. Per il dosaggio utilizzare campioni di siero o di plasma da EDTA.

NB. Usare per ogni paziente in studi longitudinali lo stesso tipo di campione (siero o plasma da EDTA).

4.2. Non pretrattare i campioni (ad es non inattivarli). I campioni non devono essere contaminati da microrganismi.

4.3. I campioni sono stabili fino ad 8 ore a temperatura ambiente e 3 giorni a 2-8 °C. E' possibile conservarli fino a 2 mesi a -20 °C o più a lungo -80 °C.

4.4. Utilizzare i campioni non diluiti. Se necessario, diluire i campioni con concentrazione superiore a quelle dell'ultimo standard fino a 1:5.

A.. 5.A. METODO DEL DOSAGGIO

5.1. Tagliare la busta sopra la cerniera richiudibile e togliere il numero di pozzetti necessari per il dosaggio (vedi 3.1.).

I pozzetti sono pronti per l'uso e non devono essere lavati prima di iniziare il dosaggio.

NB! La micropiastra è costituita da 12 strip di 8 pozzetti ciascuna.

5.2. Pipettare 100 µL di ogni standard, controllo e campione in duplicato nei rispettivi pozzetti.

5.3. Pipettare 50 µL di agente dissociante in tutti i pozzetti.

5.4. Coprire la micropiastra con il copripiastra adesivo e incubare 60 min ($\pm$ 5 min) a temperatura ambiente in agitazione costante a 850-950 rpm.

5.5. Al termine dell'incubazione lavare i pozzetti 4 volte con 300 µL di tampone di lavaggio diluito per pozzetto. Riempire con attenzione ciascun pozzetto. Dopo il lavaggio scuotere la micropiastra per allontanare il liquido residuo e lasciarla brevemente capovolta su un foglio di carta assorbente.

Non fare seccare i pozzetti. Passare immediatamente al punto successivo del dosaggio

5.6. Pipettare 100 µL di soluzione del substrato in ciascun pozzetto.

5.7. Coprire la micropiastra con il copripiastra adesivo e incubare 60 min ($\pm$ 5 min) a 37 °C ($\pm$ 1 °C).

5.8. Bloccare la reazione aggiungendo 25 µL di soluzione di stop in tutti i pozzetti.

Scuotere brevemente la micropiastra per assicurare l'omogeneità della soluzione finale.

Se necessario, pulire il fondo dei pozzetti; controllare che non ci siano bolle d'aria nei pozzetti.

Leggere le assorbanze dei pozzetti entro 15 min dall'aggiunta della soluzione di stop.

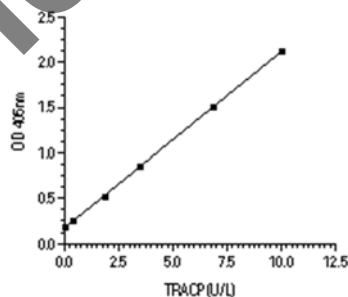
5.A. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Standard	Controlli	Campioni
Standard	100 µl	-	-
Controlli	-	100 µl	-
Campioni	-	-	100 µl
Agente dissociante	50 µl	50 µl	50 µl
Incubare 60 min (± 5 min) a temperatura ambiente in agitazione costante a 850–950 rpm, lavare 4 volte con 300 µL di tampone di lavaggio.			
Soluzione del substrato	100 µl	100 µl	100 µl
Incubare 60 min (± 5 min) a 37 °C (± 1 °C).			
Soluzione di stop	25 µl	25 µl	25 µl
Lettura fotometrica a 405 nm			

6.A. CALCOLO DEI RISULTATI (VALIDITA' DEL METODO)

- * Leggere le assorbanze a 405 nm.
- * Calcolare la media delle assorbanze di ciascun replicato degli standard. Tracciare una curva standard ponendo in ordinata la media delle assorbanze di ciascuno standard e in ascissa le rispettive attività. Calcolare l'attività dei campioni usando come interpolazione la regressione lineare.
- * L'intervallo di misura è compreso tra 0,5 a 10 U/L. Campioni con attività inferiori a quelle dell'intervallo di misura devono interpretati < 0,5 U/L. Campioni con attività superiori a quelle dell'intervallo di misura devono interpretati come > 10 U/L. Per calcolare questi ultimi valori è necessario diluire fino a 1:5 i campioni e ridosarli.
- * Calcolare per interpolazione sulla curva standard le attività di TRACP 5b in controlli e campioni. Moltiplicare il valore ottenuto per i campioni diluiti per il rispettivo fattore di diluizione

Esempio di curva di calibrazione:



- * Dati relativi al lotto di produzione
Fare riferimento al foglio del controllo di qualità.
- * Criteri di validità
 - L'assorbanza media dello standard 0 U/L deve essere < 0,400.
 - L'attività del controllo deve essere all'interno dei limiti assegnati. Fare riferimento al foglio del controllo di qualità.
 - Il coefficiente di correlazione della retta di regressione della curva standard (r^2) deve essere $\geq 0,99$.

Ripetere il dosaggio se non vengono soddisfatti questi criteri

6.B. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI/LIMITI DEL METODO

- * Un aumento dell'attività di TRACP 5b (vedi 7.E.) indica un aumento di riassorbimento osseo.

- * Risultati all'interno dei valori di riferimento non escludono la presenza di disordini del metabolismo osseo. I dati ottenuti con questo dosaggio devono essere interpretati insieme ai dati clinici o diagnostici di ciascun paziente.
- * Elevati livelli di emoglobina non interferiscono nel dosaggio.
- * Elevati livelli di lipidi possono ridurre le assorbanze dei campioni e fornire dati non corretti sull'attività di TRACP.

7. CARATTERISTICHE DEL METODO

Sono state determinate le caratteristiche del metodo durante la fase di valutazione del dosaggio.

7.A. PRECISIONE

Campione	Variazione intra saggio (n = 21)			Campione	Variazione inter saggio (n = 11)		
	media U/L	SD	CV (%)		media U/L	SD	CV (%)
Controllo	3,0	0,18	6,0	Controllo	3,3	0,19	5,8
N° 1	2,6	0,25	9,6	N° 1	2,5	0,23	9,2
N° 2	3,1	0,43	13,9	N° 2	4,2	0,35	8,3
N° 3	7,1	0,47	6,6	N° 3	7,0	0,62	8,9
				N° 4	7,2	0,38	5,4
				N° 5	2,6	0,23	8,8
				N° 6	16,1	1,16	7,2

7.B. RECUPERO

Sono stati aggiunti 3 livelli noti di attività di TRACP 5b a 3 sieri diversi. Il recupero medio è stato 100,9 % (SD = 11,3 %).

7.C. LINEARITA'

La linearità del metodo è stata calcolata dosando sieri con attività diversa (n=5). I campioni con attività elevata di TRACP 5b possono essere diluiti fino a 1:5 con il diluente per i campioni.

7.D. DOSE MINIMA RILEVABILE

La dose minima rilevabile è < 0,5 U/L.

7.E. VALORI ATTESI

I valori attesi di TRACP 5b sono stati determinati su siero di 239 donatori di sangue apparentemente sani:

Gruppo	n	Età media (intervallo)	TRACP 5b (U/L) Media ± SD
Donne in pre menopausa	144	39,5 (22 – 54)	2,59 ± 0,78
Giovani uomini in buona salute	32	36,0 (22 – 54)	3,06 ± 0,88
Donne in post menopausa	46	60,3 (41 – 81)	3,19 ± 0,85
Uomini anziani in buona salute	17	68,5 (55 – 79)	3,31 ± 0,72

Il limite superiore di normalità sono stati calcolati come media + 2 SD per le donne in pre menopausa (per le donne) e degli giovani uomini (per gli uomini) come segue:

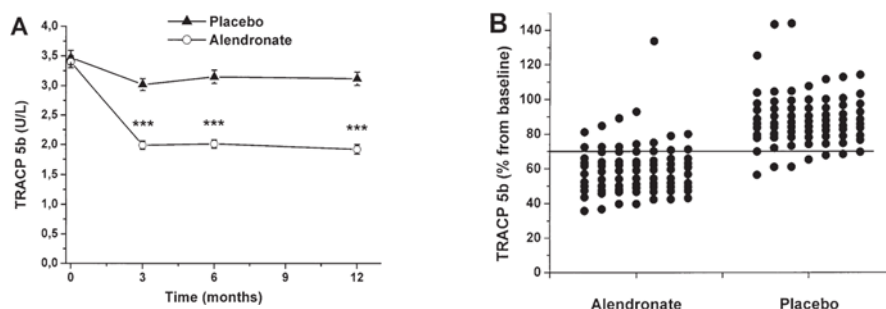
Gruppo	Limite superiore dei valori normali (media + 2SD)
Donne	4,15 U/L
Uomini	4,82 U/L

8. IMPORTANZA CLINICA DEL DOSAGGIO

ATTIVITA' DI TRACP 5B IN DONNE IN POST MENOPAUSA IN TERAPIA CON ALENDRONATO

(vedi ref. 14)

I valori di TRACP 5b sono stati determinati su siero di donne in post menopausa in terapia con 5 mg/die con alendronato per 12 mesi o trattate con placebo. Tutti i soggetti nel gruppo placebo (n = 73) e nel gruppo alendronato (n = 75) hanno ricevuto una supplementazione giornaliera di 630 mg di calcio carbonato e di 200 IU di Vitamina D.



Attività di TRACP 5b nel siero (U/L) prima del trattamento (0) e a 3, 6 e 12 mesi dall'inizio del trattamento; B) Variazioni dell'attività di TRACP 5b nel siero (U/L) a 3 mesi. Ogni punto mostra il valore per ciascun soggetto a 3 mesi rispetto al valore presente all'inizio del trattamento. La linea orizzontale del grafico B mostra la minima variazione significativa Least Significant Change (LSC = 29,5%). Una diminuzione superiore alla LSC è stata osservata nell' 82,7% dei soggetti in trattamento con alendronato e nell' 11,0% nel gruppo placebo

CONSIDERAZIONI GENERALI SULLA MANIPOLAZIONE DEL KIT

- * Per evitare cross-contaminazioni non scambiare i tappi dei flaconi.
- * Richiudere immediatamente dopo l'uso i flaconi dei reattivi per evitare l'evaporazione delle soluzioni e la contaminazione microbica.
- * La stabilità dei reattivi è garantita solo se vengono osservate le modalità di conservazione di ciascuno di essi.
- * Al termine dell'uso rimettere i reattivi nella confezione originale. Non utilizzare insieme reattivi con numero di lotto differente o di un diverso produttore (vedi punto 3.).

INFORMAZIONI PER LA SALUTE E LA SICUREZZA DURANTE L'USO

- * Rispettare le normative di sicurezza vigenti.
- * I reattivi di origine animale (vedi contenuto del kit) devono essere manipolati come se fossero potenzialmente infettivi e usati con tutte le precauzioni necessarie.

Classificazione (CLP):

Acute Tox. 4
Aquatic Chronic 3
EUH032

Indicazioni di pericolo:

EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici.
H302: Nocivo se ingerito.
H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Consigli di prudenza:

P264: Lavare accuratamente mani dopo l'uso.
P270: Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.
P273: Non disperdere nell'ambiente.
P301+310: IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico
P330: Sciacquare la bocca.
P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un punto di raccolta rifiuti pericolosi o speciali.

Il tampone di lavaggio, il diluente per i campioni, l'agente dissociante e il tampone per il substrato contengono Germall®II (diazolidinil urea): Può produrre reazioni allergiche.

CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Residui di composti o preparazioni chimiche sono in genere considerati rifiuto pericoloso. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è sottoposto a leggi e normative nazionali o locali. In caso di dubbio si consiglia di contattare le autorità locali per smaltire correttamente i rifiuti pericolosi.

Bibliografia

1. Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, Martin AW, Yam LT 1995 Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol* 104:397-402.
2. Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ 1981 Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem* 14:177-181.
3. Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, Halleen JM, Hentunen T, Yam LT 2002 Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 320:49-58.
4. 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.
5. Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari AA, Eastell R, Blumsohn A 2004 Clinical performance of immunoreactive tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34:187-194.
6. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK 2000 Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:1337-1345.
7. 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.
8. Albertini B, Casez JP, Cheneval JP, Wauters JP, Jaeger PH 2002 Low levels of 25-hydroxy-vitamin D3 (25OHD) and high serum tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) activity in hemodialysis patients: relationship to secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 13:571A-572A.
9. Halleen JM 2003 Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption (Review). *Anticancer Res* 23(2A):1027-1029.
10. Chu P, Chao TY, Lin YF, Janckila AJ, Yam LT 2003 Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 41:1052-1059.
11. Reichel H, Esser A, Roth HJ, Schmidt-Gayk H 2003 Influence of PTH Assay Methodology on Differential Diagnosis of Renal Bone Disease. *Nephrol Dial Transplant* 18:759-768.
12. Mehlhorn AT, Rechl H, Stemberger AW, Gradingner R 2002 Immunological and histochemical determination of TRAP 5b to measure osteoclast activity under antiosteolytic treatment. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P21.
13. Stepan JJ, Burckhardt P 2002 Serum activity of type 5b ACP and biochemical markers of type I collagen degradation in osteoporotic men with Klinefelter's syndrome treated with an intravenous ibandronate. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P79.
14. Halleen JM, Nenonen AM, Alatalo SL, Ivaska KK, Cheng S, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Väänänen HK 2003 Comparison of serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b with other markers of bone turnover in monitoring alendronate therapy. *J Bone Miner Res* 18(Suppl.1), Abstract SA104.
15. Rissanen JP, Hentunen TA, Halleen JM 2003 Development and characterization of a novel human in vitro bone resorption assay useful for preclinical testing of drug candidates. *J Bone Miner Res* 18(suppl.1), Abstract SA256.
16. Terpos T, Viniou N, de la Fuente J, Meletis J, Voskaridou E, Karkantaris C, Vaiopoulos G, Palermos J, Yataganas X, Goldman J, Rahemtulla 2003 Pamidronate is superior to ibandronate in decreasing bone resorption, interleukin-6 and beta 2-microglobulin in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 70:34-42.
17. Truniger R, Popp AWE, Perrelet R, Noesberger A, Lippuner K 2003 Effects of a 12 months risedronate treatment on biochemical markers of bone turnover and on serum osteoprotegerin and soluble receptor activator of NF- κ B ligand in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 18(suppl. 1), Abstract SU341.
18. Voskaridou E, Terpos E, Spina G, Palmeros J, Rahemtulla A, Loutradi A, Loukopoulos D 2003 Pamidronate is an effective treatment for osteoporosis in patients with beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 123:730-737.
19. Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK 2000 Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46:1751-1754.

SB-TR201A
Versione 09
03 giugno 2015

 EXP	GB <i>Use By</i> DE <i>Verwendbar bis</i> ES <i>Fecha de caducidad</i> IT <i>Utilizzare entro</i> FR <i>Utiliser jusqu'à</i> NL <i>Houdbaar tot</i> DK <i>Holdbar til</i> CZ <i>Použitelné do</i> SK <i>Použitelné do</i> GR <i>Ημερομηνία λήξης</i> PT <i>Prazo de validade</i> HU <i>Felhasználható</i> SE <i>Använd före</i> PL <i>Użyć przed</i>	 LOT	GB <i>Batch code</i> DE <i>Chargenbezeichnung</i> ES <i>Código de lote</i> IT <i>Codice del lotto</i> FR <i>Code du lot</i> NL <i>Lot nummer</i> DK <i>Lotnummer</i> CZ <i>Číslo šarže</i> SK <i>Číslo šarže</i> GR <i>Αριθμός Παρτίδας</i> PT <i>Código do lote</i> HU <i>Sarzszzám</i> SE <i>Lot nummer</i> PL <i>Kod partii</i>
 REF	GB <i>Catalogue number</i> DE <i>Bestellnummer</i> ES <i>Número de catálogo</i> IT <i>Numero di catalogo</i> FR <i>Référence du catalogue</i> NL <i>Catalogus nummer</i> DK <i>Katalognummer</i> CZ <i>Katalogové číslo</i> SK <i>Katalógové číslo</i> GR <i>Αριθμός καταλόγου</i> PT <i>Referência de catálogo</i> HU <i>Katalógusszám</i> SE <i>Katalognummer</i> PL <i>Numer katalogowy</i>		GB <i>Manufacturer</i> DE <i>Hersteller</i> ES <i>Fabricante</i> IT <i>Fabbricante</i> FR <i>Fabricant</i> NL <i>Fabrikant</i> DK <i>Producent</i> CZ <i>Výrobce</i> SK <i>Výrobca</i> GR <i>Κατασκευαστής</i> PT <i>Fabricante</i> HU <i>Gyártó</i> SE <i>Tillverkare</i> PL <i>Producent</i>
	GB <i>Contains sufficient for <n> tests</i> DE <i>Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen</i> ES <i>Contenido suficiente para <n> ensayos</i> IT <i>Contenuto sufficiente per "n" saggi</i> FR <i>Contenu suffisant pour "n" tests</i> NL <i>Inhoud voldoende voor "n" testen</i> DK <i>Indeholder tilstrækkeligt til "n" test</i> CZ <i>Lze použít pro <n> testů</i> SK <i>Obsah postačuje na <n> stanovení</i> GR <i>Περιεχόμενο επαρκές για «ν» εξετάσεις</i> PT <i>Conteúdo suficiente para "n" ensaios</i> HU <i>A doboz tartalma <n> vizsgálat elvégzéséhez elegendő</i> SE <i>Räcker till "n" antal tester</i> PL <i>Wystarczy na wykonanie <n> testów</i>	 IVD	GB <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i> DE <i>In-Vitro-Diagnostikum</i> ES <i>Producto sanitario para diagnóstico in vitro</i> IT <i>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</i> FR <i>Dispositif médical de diagnostic in vitro</i> NL <i>Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek</i> DK <i>Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik</i> CZ <i>In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek</i> SK <i>Zdravotnícka pomôcka in vitro</i> GR <i>Ιn Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν</i> PT <i>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro</i> HU <i>In vitro diagnosztikum</i> SE <i>Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik</i> PL <i>Wyrób do diagnostyki In Vitro</i>
	GB <i>Temperature limitation</i> DE <i>Temperaturbegrenzung</i> ES <i>Límite de temperatura</i> IT <i>Limite di temperatura</i> FR <i>Limites de température</i> NL <i>Temperatuurlimiet</i> DK <i>Temperaturbegrænsning</i> CZ <i>Teplotní rozmezí od do</i> SK <i>Teplotné rozmedzie od do</i> GR <i>Περιορισμοί θερμοκρασίας</i> PT <i>Limites de temperatura</i> HU <i>Hőmérséklettartomány</i> SE <i>Temperaturbegränsning</i> PL <i>Przestrzegać zakresu temperatury</i>		GB <i>Consult Instructions for Use</i> DE <i>Gebrauchsanweisung beachten</i> ES <i>Consulte las instrucciones de uso</i> IT <i>Consultare le istruzioni per l'uso</i> FR <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> NL <i>Raadpleeg de gebruiksaanwijzing</i> DK <i>Se brugsanvisning</i> CZ <i>Viz návod k použití</i> SK <i>Vid' návod na použitie</i> GR <i>Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης</i> PT <i>Consulte as instruções de utilização</i> HU <i>Nézze meg a Használati utasítást</i> SE <i>Se handhavandebeskrivningen</i> PL <i>Sprawdź w instrukcji obsługi</i>

	GB <i>EU Importer</i>
	DE <i>EU-Importeur</i>
	ES <i>UE Importador</i>
	IT <i>Importatore UE</i>
	FR <i>Importateur UE</i>



Immunodiagnostic Systems Limited,
10 Didcot Way, Boldon Business Park,
Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
Tel.: +44 191 519 0660
Fax: +44 191 519 0760
E-Mail: info.uk@idsplc.com

• www.idsplc.com



IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
Herriotstrasse 1
60528 Frankfurt am Main
Germany

BoneTRAP® (TRAcP 5b) ELISA

Ensayo para la determinación cuantitativa de la isoforma 5b activa de la fosfatasa
ácida tartrato resistente (TRACP)

Referencia: SB-TR201A

Para utilización exclusiva en el diagnóstico in vitro

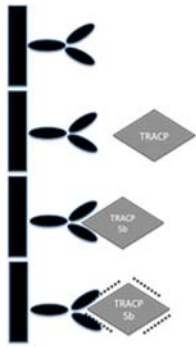
Introducción

Los macrófagos activados y los osteoclastos encargados de la resorción ósea expresan cantidades elevadas de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRACP) (1). Las dos formas del TRACP circulante en sangre humana se conocen como TRACP 5a y TRACP 5b (2). El TRACP 5b deriva de los osteoclastos y el TRACP 5a de los macrófagos (3).

Los osteoclastos secretan TRACP 5b a la circulación sanguínea como una enzima activa que se inactiva y se degrada en fragmentos antes de su eliminación de la circulación sanguínea. Por esta razón no se produce una acumulación de TRACP 5b circulante en situaciones de fallo hepático o renal (4,5). Toda la actividad del TRACP 5b en suero deriva de los osteoclastos. Las variaciones diurnas de la actividad TRACP 5b sérica son bajas y los niveles no se ven afectados por el ayuno, permitiendo así la extracción de la muestra en cualquier momento del día (5).

El ensayo BoneTRAP es un método específico para la detección de la actividad TRACP 5b recién liberada de los osteoclastos. Está dirigido a utilizarse como un indicador de resorción ósea y puede utilizarse como una herramienta en la monitorización de los cambios de la resorción ósea en situaciones de mujeres post-menopáusicas y en individuos diagnosticados de osteoporosis sometidos a terapias anti-resorptivas (HRT y bifosfonatos) (4, 6-18). La actividad de la TRACP 5b refleja el número de osteoclastos (15,19), por lo que el ensayo BoneTRAP puede utilizarse convenientemente para determinar el número de osteoclastos en cultivos de osteoclastos humanos.

Principio del ensayo



La placa está recubierta con anticuerpos anti-TRACP (monoclonales).

Se añaden los calibradores, control y muestras de los pacientes.
Se añade el reactivo para la liberación.

Se produce la disociación del TRACP 5b activo de sus proteínas de unión.

El TRACP 5b se une a los anticuerpos anti TRACP. Incubación con el sustrato pNPP (*).

La reacción, se para por la adición de hidróxido sódico. La absorción se lee fotométricamente.

- ♦ Ventajas del ensayo
- ♦ Cuantifica la actividad TRACP 5b que se libera específicamente de los osteoclastos.
- ♦ No presenta interferencias con el TRACP 5a o con otras fosfatasa.
- ♦ La hemólisis no afecta a los resultados.
- ♦ Sin variación diurna.
- ♦ No se ve afectado por las alteraciones funcionales renales o hepáticas.
- ♦ No se ve afectado por la dieta.

COMPONENTES DEL KIT

Cat. no.: SB-TR201A

1. **MICROPLAT** Microplaca: 12 x 8 pocillos (con soporte y desecante en bolsa de aluminio), divisibles, forma-F, recubiertos con anticuerpo monoclonal TRACP (ratón) y BSA, listo para usar.
2. **CTRL** Control: 2 x 2 viales, cada uno con 0,5 ml de TRACP humano recombinante, liofilizados, Xn, Nocivo, R 22-52/53, S 36-60, contiene <1% de azida sódica y BSA.
3. **CAL** Calibradores: 2 x 6 viales, cada uno con 0,5 ml de TRACP humano recombinante, liofilizados, Xn, Nocivo, R 22 - 52/53, S 36-60, contiene <1% de azida sódica y BSA. El valor exacto de cada calibrador se encuentra impreso en el informe de control de calidad.
4. **WASHBUF 25X** Tampón de Lavado: 1 botella con 40 ml de TBS/Tween (25x), pH 7,65-7,85, conteniendo < 1% Germall®II.
5. **SAMPDIL** Diluyente de la Muestra: 1 botella con 15 ml de solución del cloruro sódico, listo para usar, conteniendo < 1% Germall®II.
6. **RELEASREAG** Reactivo para la liberación: 1 vial con 8 ml, pH 6,9 - 7,1, listo para usar, conteniendo < 1% Germall®II.
7. **SUBSBUF** Tampón de Substrato: 2 viales con 10 ml cada uno de tampón acetato sódico, pH 5,95-6,05, listo para usar, conteniendo < 1% Germall®II.
8. **SUBS pNPP** Tabletas de Substrato: 4 tabletas, conteniendo p-nitrofenil fosfato (pNPP)
9. **NaOH** Solución de Parada: 1 vial con 6 ml de hidróxido sódico 0,32M, listo para usar, Xi, irritante, R36/38, S 26-37-60

1. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

MATERIAL/REACTIVO	ESTADO	ALMACENAMIENTO	ESTABILIDAD
Test kit	Cerrada	2...8 °C	Hasta la fecha de caducidad
Microplaca	Abierta	2...8 °C en su bolsa con desecante	6 semanas
Control	Reconstituido	-18 °C o inferior	6 semanas
Calibradores	Reconstituido	-18 °C o inferior	6 semanas
Tampón substrato	Abierta	2...8 °C	6 semanas
Tampón de Lavado	Diluido	2...8 °C	6 semanas
Diluyente de la Muestra	Abierta	2...8 °C	6 semanas
Reactivo de Liberación	Abierta	2...8 °C	6 semanas
Solución de Parada	Abierta	2...8 °C	6 semanas

No utilizar estos reactivos después de la fecha de caducidad.

La información de estabilidad y almacenamiento de muestras indicada anteriormente proporciona recomendaciones generales de uso en varios contextos de laboratorios. Cada laboratorio debe seguir las directrices o requisitos de las normas locales, nacionales y/o federales o de organizaciones autorizadas para establecer la estabilidad de almacenamiento y manipulación de sus propias muestras. Para obtener directrices sobre las prácticas adecuadas, consulte el documento CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

2. REACTIVOS Y MATERIALES REQUERIDOS QUE NO SE PROPORCIONAN

- 2.1. Agua desionizada.
- 2.2. Micropipetas ajustables.
- 2.3. Envases de cristal o de plástico limpios para la dilución del Tampón de Lavado y de las muestras.
- 2.4. Sistemas apropiados para el lavado de la microplaca (e.j. pipeta multicanal o lavador de ELISA).
- 2.4. Incubador de 37°C.
- 2.5. Agitador de microplacas, frecuencia de agitación 850-950 rpm, 4 mm de amplitud.
- 2.6. Lector de microplaca con filtros para 405 nm

3. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes del kit deben alcanzar la temperatura ambiente (TA) antes de comenzar con el procedimiento de la técnica.

Calcular el número de pocillos que se necesiten.

1..

2.. 3.1 Microplaca

La bolsa de aluminio debe cerrarse completamente junto con el desecante cada vez que se extraigan los pocillos. El almacenamiento y la estabilidad de los pocillos se indican en la tabla 1.

3..

4.. 3.2 Tampón de Lavado

Mezclar un volumen de Tampón de Lavado (25x) con 24 volúmenes de agua bidestilada (p. ej., 10 ml de Tampón de Lavado (25x) con 240 ml de agua). Para 8 pocillos, se requieren 7ml de Tampón de Lavado diluido.

5.. 3.3 Calibradores

Reconstituir cada uno de los calibradores liofilizados con 0,5 ml de agua bidestilada. Tiempo para la reconstitución 15 minutos.

6.. 3.4 Control

Reconstituir el control liofilizado con 0,5 ml de agua bidestilada. Tiempo para la reconstitución 15 minutos.

3.5. Solución de Substrato

Disolver 1 tableta de sustrato en 5 ml de tampón sustrato.

La solución de sustrato no debe almacenarse.

No mezclar reactivos de diferentes lotes o fabricantes.

Solamente se obtienen resultados válidos y reproducibles si se procede tal y como se ha descrito y si se utilizan los reactivos específicos para cada kit.

4. MUESTRAS

- 4.1 El ensayo está diseñado para muestras de suero y de plasma-EDTA. Debe utilizarse el mismo tipo de muestra a lo largo de todo el estudio.
- 7.. 4.2 No se necesita pretratamiento del suero, como p. ej. inactivación. Sin embargo, no debería estar contaminado con microorganismos.
- 8.. 4.3 Las muestras pueden almacenarse hasta 8 horas a temperatura ambiente, y hasta 3 días a 2-8°C. Pueden almacenarse a -20°C hasta 2 meses. Para períodos de almacenamiento más prolongados se requiere almacenar a -80°C.
- 9.. 4.4 Utilizar las muestras sin diluir. Las muestras por encima del rango pueden diluirse hasta 1:5.

5.A. PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA

- 5.1. Cortar la bolsa de aluminio por la parte superior del cierre y extraer el número de pocillos de la microplaca requeridos para la realización del test.

NB! Microplaca de 12 x 8 pocillos.

- 5.2. Añadir en duplicado 100 µl de cada uno de los Calibradores, Control y muestras.

- 5.3. Añadir 50 µl del Reactivo para la Liberación a cada pocillo.

- 5.4. Tapar la microplaca con una lámina adhesiva e incubar durante 60 min (± 5 min) a temperatura ambiente con agitación constante a 850-950 rpm.

- 5.5. Transcurrido el tiempo de incubación, lavar tres veces cada uno de los pocillos de la microplaca con 300 µl de Solución de Lavado por pocillo. Verificar que todos los pocillos estén rellenos. Después del ciclo de lavado, secar los pocillos de la microplaca sacudiéndolos suavemente en posición invertida sobre papel absorbente. **No dejar secar los pocillos. ¡Proceder inmediatamente!**

- 5.6. Añadir el 100 µl de Solución de Substrato a cada pocillo.

- 5.7. Tapar la microplaca con papel plástico e incubar durante 60 min (± 5 min) a 37°C (±1°C).

- 5.8. Parar la reacción añadiendo 25 µl de Solución de Parada a cada pocillo.

Para asegurar una buena mezcla de los componentes, agitar la placa con cuidado.

Limpiar los pocillos de la microplaca por debajo antes de la lectura fotométrica y asegurarse de que no haya burbujas en el interior de los pocillos.

La lectura debe realizarse en los 15 minutos siguientes a la adición de la Solución de Parada!

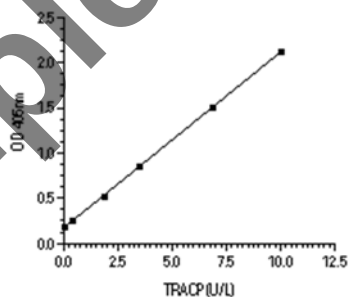
5.B. TABLA PARA EL PROCEDIMIENTO DE LA TECNICA

	Calibradores	Controles	Muestra
Calibradores	100 µl	-	-
Controles	-	100 µl	-
Muestra	-	-	100 µl
Reactivo de Liberación	50 µl	50 µl	50 µl
Incubar durante 60 min (±5) a temperatura ambiente con agitación constante a 850-950 rpm, lavar 4x con 300 µl de tampón de lavado..			
Solución de Substrato	100 µl	100 µl	100 µl
Incubar durante 60 minutos (± 5 min) a 37 °C (± 1 °C).			
Solución de Parada	25 µl	25 µl	25 µl
Lectura fotométrica a 405 nm			

6.A. CALCULO DE LOS RESULTADOS (VALIDACION)

- * Leer los valores de la D.O. a 405 nm.
- * Situar los valores medios de la D.O. de los calibradores frente a sus valores de actividad respectivos. La línea de calibración se calcula mediante una regresión lineal.
- * El rango para la cuantificación se extiende de 0,5 a 10 U/l. Las muestras por debajo del rango de medida se interpretan como < 0,5U/l. Las muestras cuya actividad se encuentre por encima del límite superior de cuantificación deben interpretarse como > 10 U/l. Estos valores no deben extrapolarse, sino que las muestras deberían volver a testarse tras su dilución (hasta 1:5).
- * Las actividades del TRACP 5b para el control y para las muestras se extrapolan de la línea de calibración. Si se tienen que utilizar muestras diluidas, debe tenerse en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo de línea de calibración:



- * Datos específicos de lote
Ver Certificado de Control de Calidad.

- * Criterios de Validación
 - La media de la D.O. del Calibrador de 0 U/L, debe de ser <0,400.
 - La actividad del control debe situarse dentro de su rango nominal. Consultar el Certificado del Control de Calidad para ver los valores asignados.
 - El coeficiente de correlación (r^2) de la línea de calibración debe de ser > 0,99.

Repetir el ensayo si los resultados no cumplen con las especificaciones!

6.B. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS/LIMITACIONES DEL METODO

- * Un incremento de la actividad TRACP 5b (ver 7.E.) es indicativo de una actividad incrementada de la resorción ósea.

- * Los resultados dentro del rango de referencia no excluyen completamente las alteraciones en el metabolismo óseo. Por esta razón, los resultados deberían siempre interpretarse en conjunto con el resto de datos clínicos y parámetros diagnósticos.
- * Las concentraciones de hemoglobina elevadas no influyen en los resultados del test.
- * Concentraciones de lípidos elevadas podrían reducir los valores de la DO y distorsionar el cálculo de los valores de la actividad TRACP.

7. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Durante la evaluación del ensayo, se determinaron las siguientes características.

7.A. PRECISIÓN

Muestra	Variación intra-ensayo (n = 21)			Muestra	Variación Inter.-ensayo (n = 11)		
	Media U/L	SD	CV (%)		Media U/L	SD	CV (%)
Control	3,0	0,18	6,0	Control	3,3	0,19	5,8
Nº 1	2,6	0,25	9,6	Nº 1	2,5	0,23	9,2
Nº 2	3,1	0,43	13,9	Nº 2	4,2	0,35	8,3
Nº 3	7,1	0,47	6,6	Nº 3	7,0	0,62	8,9
				Nº 4	7,2	0,38	5,4
				Nº 5	2,6	0,23	8,8
				Nº 6	16,1	1,16	7,2

7.B. RECUPERACION

Se añadieron 3 concentraciones de TRACP 5b con actividad conocida a 3 sueros diferentes y se determinó una media de recuperación del 100,9% (DS = 11,3%).

7.C. LINEALIDAD DE LA DILUCION

La linealidad se determinó utilizando sueros de diferente actividad (n=5). Las muestras con una elevada actividad TRACP 5b se pueden diluir hasta 1:5 con Diluyente de la Muestra.

7.D. LIMITE DE LA CUANTIFICACION

El límite de la cuantificación es < 0,5 U/L.

A.. 7.E. VALORES ESPERADOS

Los valores esperados de TRACP5b se determinaron a partir de 239 muestras de suero procedentes de donantes sanos, como se indica a continuación:

Grupo	n	Media de edad TRACP 5b (U/L)	
		(rango)	Media ± SD
Mujeres premenopáusicas sanas	144	39,5 (22 – 54)	2,59 ± 0,78
Hombres jóvenes sanos	32	36,0 (22 – 54)	3,06 ± 0,88
Hombres postmenopáusicos sanos	46	60,3 (41 – 81)	3,19 ± 0,85
Hombres sanos de edad avanzada	17	68,5 (55 – 79)	3,31 ± 0,72

El límite superior de normalidad se calculó como la media + 2 SD del grupo de mujeres pre menopáusicas (para las mujeres) y del grupo de hombres jóvenes (para los hombres):

Grupo	Límite superior de normalidad (media + 2SD)
Mujeres	4,15 U/L
Hombres	4,82 U/L

8. IMPORTANCIA CLINICA

TRACP 5B ACTIVIDAD TRACP 5B EN MUJERES POSTMENOPAÚSICAS SOMETIDAS A TERAPIA CON ALENDRONATO

(ver ref. 14)

Los valores de TRACP 5b se calcularon a partir de las muestras de suero de un grupo de mujeres postmenopáusicas que recibían 5 mg de alendronato diario durante 12 meses en un estudio clínico

en los que se administró un placebo al grupo de control. Todos los individuos del grupo al que le suministró un placebo (n= 73) o el tratamiento con alendronato (n=75), recibieron un suplemento diario de 630 mg de carbonato cálcico y de 200 UI de Vitamina D.



A) Actividad TRACP 5b en suero (U/L) antes de comenzar con el tratamiento (0) y a los 3, 6 y 12 meses; B) Representación del cambio de la actividad TRACP 5b en suero a los 3 meses. Cada mancha muestra el valor de un individuo a los 3 meses comparado con el valor de ese mismo individuo a nivel basal (antes de comenzar con el tratamiento). La línea en B) muestra el Menor Cambio Significativo (LSC = 29,5 %). En el 82,7% de los individuos se observó una disminución superior al LSC en el grupo del alendronato, y en el 11% de los individuos en el grupo del placebo.

ADVERTENCIAS GENERALES SOBRE LA MANIPULACION

- * Para evitar contaminaciones cruzadas, no intercambiar los tapones de los viales.
- * Los reactivos deben cerrarse inmediatamente después de utilizarse, para evitar la evaporación y la contaminación microbiana.
- * Tras su utilización, los reactivos deben almacenarse según las indicaciones proporcionadas para garantizar su vida media.
- * Tras su utilización, todos los componentes del kit deberían almacenarse en su envase original, para evitar mezclar reactivos de diferentes tipos de ensayo o de diferentes lotes (ver punto 3.).

INFORMACION SOBRE SEGURIDAD E HIGIENE

- * Debe cumplirse la normativa sobre seguridad e higiene en el trabajo de cada país.
- * Los reactivos de origen animal (ver componentes del kit) deberían manipularse como potencialmente infecciosos y utilizarse con todas las precauciones necesarias.

Clasificación (CLP):

Acute Tox. 4: H302

Aquatic Chronic 3: H412

EUH032

Indicaciones de peligro:

EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

H302: Nocivo en caso de ingestión.

H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Consejos de prudencia:

P264: Lavarse manos concienzudamente tras la manipulación.

P270: No comer, beber ni fumar durante su utilización.

P273: Evitar su liberación al medio ambiente.

P301+310: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P330: Enjuagarse la boca.

P501: Eliminar el contenido/el recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

El Tampón de Lavado, el Diluyente de la Muestra, el reactivo de Liberación, y el Tampón Substrato contienen Germall®II (urea diazolinilada): pueden producir reacciones alérgicas.

CONSIDERACIONES SOBRE ELIMINACION DE LOS RESIDUOS

Los residuos de los agentes químicos y de las preparaciones se consideran en general como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada a través de las leyes nacionales y regionales y de sus normativas. Contactar con las autoridades locales o con las compañías

de gestión homologadas, las cuales aconsejarán sobre como proceder para la eliminación de los residuos peligrosos.

Bibliografía

1. Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, Martin AW, Yam LT 1995 Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol* 104:397-402.
2. Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ 1981 Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem* 14:177-181.
3. Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, Halleen JM, Hentunen T, Yam LT 2002 Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 320:49-58.
4. 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.
5. Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari AA, Eastell R, Blumsohn A 2004 Clinical performance of immunoreactive tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34:187-194.
6. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK 2000 Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:1337-1345.
7. 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.
8. Albertini B, Casez JP, Cheneval JP, Wauters JP, Jaeger PH 2002 Low levels of 25-hydroxy-vitamin D3 (25OHD) and high serum tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) activity in hemodialysis patients: relationship to secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 13:571A-572A.
9. Halleen JM 2003 Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption (Review). *Anticancer Res* 23(2A):1027-1029.
10. Chu P, Chao TY, Lin YF, Janckila AJ, Yam LT 2003 Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 41:1052-1059.
11. Reichel H, Esser A, Roth HJ, Schmidt-Gayk H 2003 Influence of PTH Assay Methodology on Differential Diagnosis of Renal Bone Disease. *Nephrol Dial Transplant* 18:759-768.
12. Mehlhorn AT, Rech H, Stemberger AW, Gradinger R 2002 Immunological and histochemical determination of TRAP 5b to measure osteoclast activity under antiosteolytic treatment. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P21.
13. Stepan JJ, Burckhardt P 2002 Serum activity of type 5b ACP and biochemical markers of type I collagen degradation in osteoporotic men with Klinefelter's syndrome treated with an intravenous ibandronate. *Calcif Tissue Int* 70, Abstract P79.
14. Halleen JM, Nenonen AM, Alatalo SL, Ivaska KK, Cheng S, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Väänänen HK 2003 Comparison of serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b with other markers of bone turnover in monitoring alendronate therapy. *J Bone Miner Res* 18(Suppl.1), Abstract SA104.
15. Rissanen JP, Hentunen TA, Halleen JM 2003 Development and characterization of a novel human in vitro bone resorption assay useful for preclinical testing of drug candidates. *J Bone Miner Res* 18(suppl.1), Abstract SA256.
16. Terpos T, Viniou N, de la Fuente J, Meletis J, Voskaridou E, Karkantaris C, Vaiopoulos G, Palermos J, Yataganas X, Goldman J, Rahemtulla 2003 Pamidronate is superior to ibandronate in decreasing bone resorption, interleukin-6 and beta 2-microglobulin in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 70:34-42.
17. Truniger R, Popp AWE, Perrelet R, Noesberger A, Lippuner K 2003 Effects of a 12 months risedronate treatment on biochemical markers of bone turnover and on serum osteoprotegerin and soluble receptor activator of NF- κ B ligand in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 18(suppl. 1), Abstract SU341.
18. Voskaridou E, Terpos E, Spina G, Palmeros J, Rahemtulla A, Loutradi A, Loukopoulos D 2003 Pamidronate is an effective treatment for osteoporosis in patients with beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 123:730-737.
19. Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK 2000 Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46:1751-1754.

SB-TR201A

Versión 09

03 de junio de 2015

	GB Use By DE Verwendbar bis ES Fecha de caducidad IT Utilizzare entro FR Utiliser jusque NL Houdbaar tot DK Holdbar til CZ Použitelné do SK Použiteľné do GR Ημερομηνία λήξης PT Prazo de validade HU Felhasználható SE Använd före PL Użyć przed		GB Batch code DE Chargenbezeichnung ES Código de lote IT Codice del lotto FR Code du lot NL Lot nummer DK Lotnummer CZ Číslo šarže SK Číslo šarže GR Αριθμός Παρτίδας PT Código do lote HU Szarzsorszám SE Lot nummer PL Kod partii
	GB Catalogue number DE Bestellnummer ES Número de catálogo IT Numero di catalogo FR Référence du catalogue NL Catalogus nummer DK Katalognummer CZ Katalogové číslo SK Katalogové číslo GR Αριθμός καταλόγου PT Referência de catálogo HU Katalógusszám SE Katalognummer PL Numer katalogowy		GB Manufacturer DE Hersteller ES Fabricante IT Fabbricante FR Fabricant NL Fabrikant DK Producent CZ Výrobce SK Výrobca GR Κατασκευαστής PT Fabricante HU Gyártó SE Tillverkare PL Producent
	GB Contains sufficient for <n> tests DE Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen ES Contenido suficiente para <n> ensayos IT Contenuto sufficiente per "n" saggi FR Contenu suffisant pour "n" tests NL Inhoud voldoende voor "n" testen DK Indeholder tilstrækkeligt til "n" test CZ Lze použít pro <n> testů SK Obsah postačuje na <n> stanovení GR Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις PT Conteúdo suficiente para "n" ensaios HU A doboz tartalma <n> vizsgálat elvégzéséhez elegendő SE Räcker till "n" antal tester PL Wystarczy na wykonanie <n> testów		GB In-Vitro Diagnostic Medical Device DE In-Vitro-Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro FR Dispositif médical de diagnostic in vitro NL Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek DK Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik CZ In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek SK Zdravotnícka pomôcka in vitro GR In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν PT Dispositivo médico para diagnóstico in vitro HU In vitro diagnosztikum SE Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik PL Wyrób do diagnostyki In Vitro
	GB Temperature limitation DE Temperaturbegrenzung ES Límite de temperatura IT Limiti di temperatura FR Limites de température NL Temperatuurlimiet DK Temperaturbegrænsning CZ Teplotní rozmezí od do SK Teplotné rozmedzie od do GR Περιορισμοί θερμοκρασίας PT Limites de temperatura HU Hőmérséklettartomány SE Temperaturbegränsning PL Przestrzegać zakresu temperatury		GB Consult Instructions for Use DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consulte las instrucciones de uso IT Consultare le istruzioni per l'uso FR Consulter les instructions d'utilisation NL Raadpleeg de gebruiksaanwijzing DK Se brugsanvisning CZ Viz návod k použití SK Vid' návod na použitie GR Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης PT Consulte as instruções de utilização HU Nézze meg a Használati utasítást SE Se handhavandebeskrivningen PL Sprawdź w instrukcji obsługi

	GB	EU Importer
	DE	EU-Importeur
	ES	UE Importador
	IT	Importatore UE
	FR	Importateur UE



Immunodiagnostic Systems Limited,
10 Didcot Way, Boldon Business Park,
Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
Tel.: +44 191 519 0660
Fax: +44 191 519 0760
E-Mail: info.uk@idsplc.com



IDS Immunodiagnostic Systems GmbH
Herriotstrasse 1
60528 Frankfurt am Main
Germany