

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОЙ ИЗОФОРМЫ 5b ТАРТРАТ-РЕЗИСТЕНТНОЙ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ (TRACP)

SB-TR201A, BoneTRAP Assay

Каталог. № : SB-TR201A

Методика от 20-09-

Количество : 96

2012

Производитель: IDS (Великобритания)

Версия 6



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Только для использования в *in-Vitro* диагностике
Для использования в исследовательских целях
Не для использования в диагностических процедурах

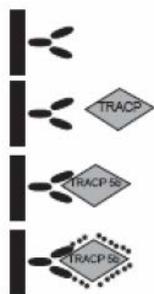
ВВЕДЕНИЕ

Большое количество тартрат-резистентной кислой фосфатазы (TRACP) экспрессируется остеокластами в процессе резорбции кости и активированными макрофагами (1). В кровотоке у человека циркулируют две формы TRACP, известные как TRACP 5a и TRACP 5b (2). TRACP 5b происходит из остеокластов, а TRACP 5a имеет макрофагальное происхождение (3).

Остеокласты секретируют TRACP 5b в кровотоке в виде активного энзима, который инактивируется и разрушается на фрагменты перед удалением из кровотока. Таким образом активный TRACP 5b не накапливается в кровотоке при почечной или печеночной недостаточности (4,5). Весь активный TRACP 5b присутствующий в сыворотке, происходит из остеокластов. Суточные колебания активности сывороточного TRACP 5b низкие, на его уровень не влияет питание, что позволяет выполнять сбор образцов в любое время дня (5).

Данный метод BoneTRAP® - это специфический метод определения активности TRACP 5b, свежесекретированного остеокластами. Он предназначен для использования в качестве показателя резорбции кости и может быть использован в целях мониторинга изменений процесса резорбции кости у женщин в постменопаузе и у пациентов с диагнозом остеопороз, получающих анти-резорбтивную терапию (HRT и бисфосфонатами) (4, 6-18). *In vitro*, активность TRACP 5b отражает количество остеокластов (15,19), и, следовательно метод BoneTRAP® может быть удобно использовать для определения количества остеокластов в культуре человеческих остеокластов.

ПРИНЦИП ТЕСТА



Лунки микропланшета покрыты анти-TRACP антителами (моноклональными).

Стандарты, контроли и образцы пациента вносят в лунки микропланшета. В лунки вносят релизинг-реагент. Происходит диссоциация активной TRACP 5b от связывающих белков. TRACP 5b связывается с анти-TRACP антителами.

Инкубация с субстратом pNPP (*).

Реакция останавливается добавлением гидроксида натрия. Абсорбция считывается с помощью микропланшетного спектрофотометра.

Преимущества теста

- Измерение активности TRACP 5b, секретируемой специфически остеокластами.
- Отсутствие интерференции с TRACP 5a или другими фосфатазами.
- Гемолиз не оказывает влияния на результаты.
- Отсутствие суточных колебаний.
- Функциональные нарушения почек или печени не оказывают

влияния.

- Отсутствие влияния диеты.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- MICROPLAT** микропланшет: 12 x 8 лунок (с рамкой-держателем в пакете из фольги с осушителем), F-формы, покрыт моноклональными анти-TRACP антителами (мыши) и BSA, готов к использованию.
- CTRL** контроли: 2 x 2 флакона по 0.5 мл каждый, человеческая рекомбинантная TRACP, лиофилизированная, Хп, вредное вещество, R 22-52/53, S 36-60, содержит < 1 % азида натрия и BSA.
- CAL** стандарты: 2 x 6 флаконов по 0.5 мл каждый, человеческая рекомбинантная TRACP, лиофилизированная, Хп, вредное вещество, R 22-52/53, S 36-60, содержит < 1 % азида натрия и BSA. Точная концентрация каждого стандарта указана на этикетках флаконов.
- WASHBUF 25X** Буфер для промывок: 1 флакон 40 мл TBS/Tween (концентрат 25x), pH 7.65 – 7.85, содержит < 1 % Germall®II.
- SAMPDIL** Буфер для разведения образцов: 1 флакон 15 мл, раствор хлорида натрия, готов к использованию, содержит < 1 % Germall®II.
- RELEASREAG** релизинг-реагент: 1 флакон 8 мл, pH 6.9 – 7.1, готов к использованию, содержит < 1 % Germall®II.
- SUBSBUF** субстратный буфер: 2 флакона по 10 мл каждый, натрий ацетатный буфер, pH 5.95 – 6.05, готов к использованию, содержит < 1 % Germall®II.
- SUBS pNPP** субстрат, в таблетках: 4 таблетки, содержат p-нитрофенил фосфат (pNPP).
- NaOH** стоп-раствор: 1 флакон 6 мл, 0.32 М гидроксид натрия, готов к использованию, Xi, раздражающее вещество, R 36/38, S 26-37-60.

1. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

МАТЕРИАЛ/РЕАГЕНТ	СОСТОЯНИЕ	ХРАНЕНИЕ	СТАБИЛЬНОСТЬ
Тестовый набор	Невскрытый	2...8 °C	До истечения срока годности
Микропланшет	Вскрытый	2...8 °C в пакете с осушителем	6 недель
Контроль	Растворенный	-18 °C или ниже	6 недель
Калибраторы	Растворенные	-18 °C или ниже	6 недель
Субстратный Буфер	Вскрытый	2...8 °C	6 недель
Буфер для промывок	Разведенный	2...8 °C	6 недель
Растворитель образцов	Вскрытый	2...8 °C	6 недель
Релизинг-реагент	Вскрытый	2...8 °C	6 недель
Стоп-раствор	Вскрытый	2...8 °C	6 недель

Не используйте реагенты после истечения срока годности.

2. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ

- Вода для инъекций. Использование деионизированной воды может помешать выполнению исследований.
- Калиброванные микропипетки.
- Чистые стеклянные или пластиковые контейнеры для разведения буфера для промывок и образцов.
- Подходящее устройство для промывки микропланшет (например, мультистеппер или микропланшетный вошер).
- Инкубатор на 37 °C.
- Микропланшетный шейкер, с частотой шейкирования 850–950 об/мин, амплитудой 4 мм.
- Микропланшетный спектрофотометр с фильтром 405 нм.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все компоненты должны достичь комнатной температуры перед началом тестирования. Рассчитайте количество лунок, необходимое для текущей постановки.

3.1. Микропланшет

После того, как достанете необходимое количество стрипов, алюминиевый пакет с осушителем и оставшимися стрипами должен быть тщательно закрыт. Хранение и стабильность стрипов описаны в таблице 1.

3.2. Буфер для промывок

Смешайте один объем буфера для промывок (25x) с 24 объемами воды для инъекций (например, 10 мл буфера для промывок (25x) и 240 мл воды). Для промывки 1 стрипа (8 лунок) требуется 7 мл разведенного буфера для промывок.

3.3. Стандарты

Растворите лиофилизированные стандарты, каждый в 0.5 мл воды для инъекций. Время растворения 15 минут.

3.4. Контроли

Растворите лиофилизированные контроли, каждый в 0.5 мл воды для инъекций. Время растворения 15 минут.

3.5. Раствор субстрата

Растворите 1 таблетку в 5 мл буфера для субстрата.

Раствор субстрата не хранить.

Не смешивайте реагенты различных лотов или производителей. Достоверные и воспроизводимые результаты могут быть получены только при точном соблюдении процедуры анализа и при использовании специфических реагентов набора.

4. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

4.1. Данным методом должны анализироваться образцы сыворотки или ЭДТА плазмы.

Примечание: Все исследования должны проводиться с использованием одного и того же типа образцов.

4.2. Не должна проводиться обработка образцов сыворотки, например, инактивация. Образцы не должны быть загрязнены микроорганизмами.

4.3. Образцы могут храниться до 8 часов при комнатной температуре и до 3 дней при 2-8 °С. При -20 °С образцы могут храниться до 2 месяцев. Для более длительного хранения необходимо использовать температуру -80 °С.

4.4. Образцы анализируются не разведенными. Образцы, концентрации которых выше диапазона измеряемых значений, могут быть разведены до 1:5.

5.А. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

5.1. Разрежьте алюминиевый пакет выше застёжки и достаньте требуемое количество стрипов (см. 3.1.).

Лунки микропланшета готовы к использованию и не должны быть предварительно промыты.

Примечание: Микропланшет 12x8 лунок.

5.2. Внесите 100 мкл каждого стандарта, контроля и образца в соответствующие лунки микропланшета, в дублях.

5.3. Внесите 50 мкл релизинг-реагента во все лунки.

5.4. Закройте микропланшет адгезивной пленкой и инкубируйте 60 минут (± 5 минут) при комнатной температуре при постоянной шейкировке на 850–950 об/мин.

5.5. После окончания инкубации промойте лунки микропланшета 4 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок на каждую лунку. Следите за тем, чтобы все лунки наполнялись. После последнего цикла промывки переверните Микропланшет и постучите им по чистой фильтровальной бумаге.

Не позволяйте лункам пересыхать! Переходите к следующему шагу немедленно!

5.6. Внесите по 100 мкл субстратного раствора в каждую лунку.

5.7. Закройте микропланшет адгезивной пленкой и инкубируйте 60 минут (± 5 минут) при 37 °С (± 1 °С).

5.8. Остановите реакцию добавлением 25 мкл стоп-раствора в каждую лунку.

Убедитесь, что растворы хорошо перемешаны, аккуратно постучите по микропланшету.

Перед считыванием оптической плотности (ОП) убедитесь, что доньшки лунок чистые, а в лунках нет воздушных пузырей.

Считывание ОП необходимо выполнить в течение 15 минут после добавления стоп-раствора!

5.В. ТАБЛИЦА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

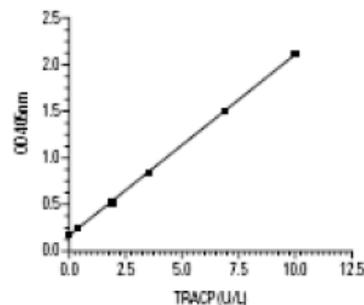
	Калибраторы	Контроли	Образец
Калибраторы	100 мкл	---	---
Контроли	---	100 мкл	---
Образец	---	---	100 мкл
Релизинг-реагент	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубировать 60 минут (± 5 минут) при комнатной температуре при постоянном шейкировании на 850–950 об/мин, промыть 4 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок на каждую лунку.			
Субстратный раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубировать 60 минут (± 5 минут) при 37 °С (± 1 °С).			
Стоп раствор	25 мкл	25 мкл	25 мкл
Считать ОП при 405 нм			

6.А. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ (ДОСТОВЕРНОСТЬ)

- Считайте ОП при 405 нм.
- Отложите средние значения ОП стандартов против соответствующих значений активности. Калибровочная кривая рассчитывается линейной регрессией.

- Измеряемый диапазон от 0.5 до 10 Ед/л. Результаты для образцов, концентрации которых ниже диапазона измеряемых значений, должны интерпретироваться как < 0.5 Ед/л. Результаты для образцов с активностью выше диапазона измеряемых значений должны интерпретироваться как > 10 Ед/л. Эти значения не могут быть экстраполированы, а образец должен быть разведен (до 1:5) и протестирован еще раз.
- Активность TRACP 5b контролей и образцов может быть считана непосредственно из калибровочной кривой. Если образец был разведен, то результат, полученный из калибровочной кривой, должен быть умножен на коэффициент разведения.

Пример калибровочной кривой:



- Лот-специфические данные**
Смотрите в сертификате контроля качества.
- Критерии достоверности**
 - Средняя ОП стандарта 0 Ед/л должна быть < 0.400 .
 - Активность контролей должна лежать в диапазоне допустимых значений, указанном в сертификате контроля качества.
 - Коэффициент корреляции (r^2) калибровочной кривой должен быть ≥ 0.99 .

Повторите постановку, если результаты тестирования не удовлетворяют указанным критериям!

6.В. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ/ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Повышенная активность TRACP 5b (см. 7.Е.) указывает на усиление процесса резорбции кости.
- Результаты в диапазоне референсных значений не исключают полностью наличия нарушений метаболизма кости. Все результаты должны интерпретироваться только в совокупности с клиническими данными и результатами других диагностических процедур.
- Высокая концентрация гемоглобина не влияет на результаты данного анализа.
- Высокая концентрация липидов может снижать значения ОП и, следовательно, искажать результаты тестирования активности TRACP.

7. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

В ходе оценки метода были определены следующие характеристики.

7.А. ТОЧНОСТЬ

Образец	Воспроизводимость внутри серии (n=21)			Образец	Воспроизводимость Между сериями (n=11)		
	Средне е, Ед/л	SD	CV, (%)		Средне е, Ед/л	SD	CV, (%)
Контроль	3.0	0.18	6.0	Контроль	3.3	0.19	5.8
№ 1	2.6	0.25	9.6	№ 1	2.5	0.23	9.2
№ 2	3.1	0.43	13.9	№ 2	4.2	0.35	8.3
№ 3	7.1	0.47	6.6	№ 3	7.0	0.62	8.9
				№ 4	7.2	0.38	5.4
				№ 5	2.6	0.23	8.8
				№ 6	16.1	1.16	7.2

7.В. ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Среднее извлечение было определено при тестировании данным методом 3 различных образцов сывороток, к которым были добавлены 3 различных известных уровня активности TRACP 5b, и оно составило 100.9 % (SD = 11.3 %).

7.С. ЛИНЕЙНОСТЬ РАЗВЕДЕНИЯ

Линейность определяли с использованием образцов сывороток с различной активностью (n=5). Образцы с высокой активностью TRACP 5b могут быть разведены до 1:5 буфером для разведения образцов.

7.Д. ПРЕДЕЛ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Предел определения составляет < 0.5 Ед/л.

7.Е. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Ожидаемые значения активности TRACP 5b были определены при тестировании 239 образцов сывороток, взятых у здоровых доноров крови:

Группа	n	Средний возраст (диапазон)	TRACP 5b (Ед/л) Среднее ± SD
Здоровые женщины в менопаузе	144	39.5 (22-54)	2.59 ± 0.78
Здоровые молодые мужчины	32	36.0 (22-54)	3.06 ± 0.88
Здоровые женщины в постменопаузе	46	60.3 (41-81)	3.19 ± 0.85
Здоровые пожилые мужчины	17	68.5 (55-79)	3.31 ± 0.72

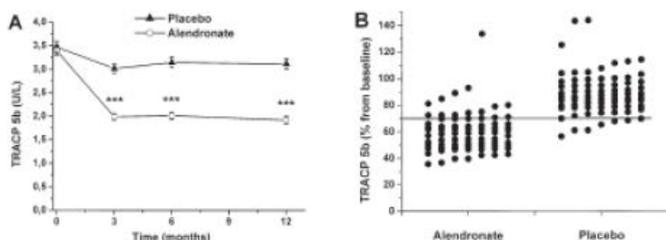
Верхний предел нормы был рассчитан как среднее + 2 SD для женщин в менопаузе (для женщин) и молодых мужчин (для мужчин):

Группа	Верхний предел нормы (Среднее + 2SD)
Женщины	4.15 Ед/л
Мужчины	4.82 Ед/л

8. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Активность TRACP 5b у женщин в постменопаузе, получающих терапию алендронатом (см. ссылку 14)

Значения TRACP 5b определяли в образцах сывороток женщин в постменопаузе, получающих 5 мг алендроната ежедневно в течение 12 месяцев в плацебо-контролируемом исследовании. Все пациентки, получающие плацебо (n = 73) и алендронат (n = 75) получали ежедневно дополнительно 630 мг карбоната кальция и 200 МЕд витамина D.



А) Активность TRACP 5b в сыворотке (Ед/л) перед началом лечения (0) и через 3, 6 и 12 месяцев; В) Изменения сывороточного TRACP 5b через 3 месяца. Каждая точка представляет одно индивидуальное значение через 3 месяца, по сравнению с базовым значением, полученным для той же пациентки (перед началом лечения). На графике В) показаны наименьшие значимые изменения (LSC = 29.5%). Снижение более, чем LSC, наблюдалось у 82.7% пациенток из группы, получающей алендронат, и у 11.0% пациенток из плацебо группы.

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- Для предотвращения перекрестной контаминации не меняйте флаконы и крышки флаконов.
- Закрывайте флаконы с реагентами сразу после использования, чтобы не допустить испарения и микробного заражения.
- Для гарантии качества реагентов в течение срока годности, после использования реагенты должны храниться как указано в данной инструкции.
- После использования все компоненты набора должны храниться в оригинальной упаковке, чтобы избежать смешивания реагентов с реагентами других наборов или лотов (см. также п.3).

ИНФОРМАЦИЯ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

- Необходимо соблюдать национальные требования техники безопасности и правила охраны труда.
- С реагентами животного происхождения (см. компоненты набора) необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными материалами, с соблюдением всех необходимых мер предосторожности.
- R 22: опасно при проглатывании.
R 36/38: вещество, раздражающее глаза и кожу.
R 52/53: опасное вещество для водных организмов, может оказывать продолжительный негативный эффект на водную окружающую среду.
S 26: В случае попадания в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу.
S 36: Носите соответствующую защитную одежду.
S 37: Носите соответствующие перчатки.
S 60: Данный материал и контейнер должны утилизироваться как опасные отходы.

Буфер для промывок, буфер для разведения образцов, релизинг-реагент и субстратный буфер содержат Gemall®II (диазолидинил мочевины): может вызывать аллергические реакции.

УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Остатки химических веществ и образцов обычно рассматриваются как опасные отходы. Утилизация такого типа отходов регулируется национальными или локальными законами и предписаниями. За информацией об утилизации опасных отходов обращайтесь в региональные муниципальные органы власти или профессиональные компании по утилизации отходов.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕВ»
ул. Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com