



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

Кат. №: SB-TR201A  
Производитель: Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd)

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

Методика от 07-09-2010  
Версия 5

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 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

1. **MICROPLAT** микропланшет: 12 x 8 лунок (с рамкой-держателем в пакете из фольги с осушителем), F-формы, покрытый моноклональными анти-TRACP антителами (мыши) и BSA, готов к использованию.
2. **CTRL** контроли: 2 x 2 флакона по 0.5 мл каждый, человеческая рекомбинантная TRACP, лиофилированная, Хп, вредное вещество, R 22-52/53, S 36-60, содержит < 1 % азида натрия и BSA.
3. **CAL** стандарты: 2 x 6 флаконов по 0.5 мл каждый, человеческая рекомбинантная TRACP, лиофилированная, Хп, вредное вещество, R 22-52/53, S 36-60, содержит < 1 % азида натрия и BSA. Точная канцентрация каждого стандарта указана на этикетках флаконов.
4. **WASHBUF 25X** Буфер для промывок: 1 флакон 40 мл TBS/Tween (концентрат 25x), pH 7.65 – 7.85, содержит < 1 % Germall@II.
5. **SAMPDIL** Буфер для разведения образцов: 1 флакон 15 мл, раствор хлорида натрия, готов к использованию, содержит < 1 % Germall@II.
6. **RELEASREAG** релизинг-реагент: 1 флакон 8 мл, pH 6.9 – 7.1, готов к использованию, содержит < 1 % Germall@II.
7. **SUBSBUF** субстратный буфер: 2 флакона по 10 мл каждый, натрий ацетатный буфер, pH 5.95 – 6.05, готов к использованию, содержит < 1 % Germall@II.
8. **SUBS pNPP** субстра, в таблетках: 4 таблетки, содержат р-нитрофелин фосфат (pNPP).
9. **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
Микро-планшет	Невскрытый	2...8 °C	До истечения срока годности
	Вскрытый	2...8 °C, в пакете с осушителем	6 недель
контроль	растворенный	-18 °C или ниже	6 недель
Стандарты	Растворенные	-18 °C или ниже	6 недель
Субстратный буфер	Вскрытый	2...8 °C	6 недель
Буфер для промывок	Разведенный	2...8 °C	6 недель
Буфер для разведения 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.

### МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- 2.1. Вода для инъекций. Использование деионизированной воды может помешать выполнению исследований.
- 2.2. Калиброванные микропипетки.
- 2.3. Чистые стеклянные или пластиковые контейнеры для разведения буфера для промывок и образцов.
- 2.4. Подходящее устройство для промывки микропланшет (например, степлер или микропланшетный вошер).
- 2.5. Инкубатор на 37 °C.
- 2.6. Микропланшетный шейкер, с частотой шейкирования 850–950 грт, амплитудой 4 мм.
- 2.7. 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 контаминированы 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 дублиях.

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

5.4. Закройте микропланшет адгезивной пленкой и инкубируйте 60 минут ( $\pm 5$  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 ( $\pm 5$  минут) при 37 °С ( $\pm 1$  °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 донышки лунок чистые, а в лунках нет воздушных пузырей.**

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

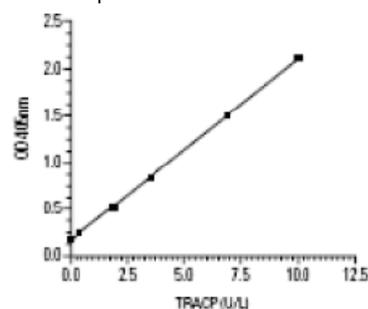
## 5 В. ТАБЛИЦА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

	Стандарты	Контроль	Образцы
Стандарты	100 мкл	-	-
Контроли	-	100 мкл	-
Образцы	-	-	100 мкл
Релизинг-реагент	50 мкл	50 мкл	50 мкл
инкубируйте 60 минут ( $\pm 5$ минут) при комнатной температуре при постоянной шейкировке на 850–950 грп., промойте 4 раза, используя по 300 мкл буфера для промывок на каждую лунку.			
Субстратный раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
инкубируйте 60 минут ( $\pm 5$ минут) при 37 °С ( $\pm 1$ °С)			
Стоп-раствор	25 мкл	25 мкл	25 мкл
Считайте 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  $\geq 0.99$ .

**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.

**7А. Точность**

Образец	Воспроизводимость внутри серии (n = 21)			Образец	Воспроизводимость между сериями (n = 11)		
	Среднее, Ед/л	SD	CV (%)		Среднее, Ед/л	SD	CV (%)
Контроль	3.0	0.18	6.0	Контроль	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

**7В. 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 %).

**7С. 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.

**7Д. Предел определения**

Предел определения составляет < 0.5 Ед/л.

**7Е. 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 пременопаузе	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

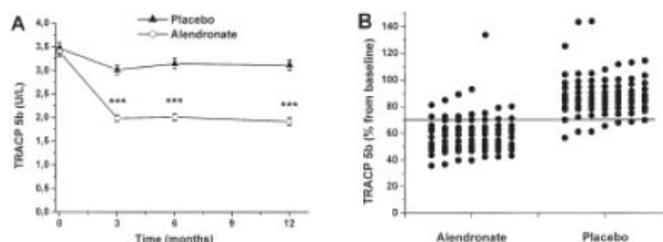
Верхний предел нормы был рассчитан как среднее + 2 SD для женщин в пременопаузе (для женщин) и молодых мужчин (для мужчин):

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 Germall®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.

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

ООО «ДИАМЕБ»  
 ООО «БиоТехЛаб-С»  
 ул. Чорновола, 97  
 г. Ивано-Франковск, 76005  
 тел.: +38 (0342) 775 122  
 факс: +38 (0342) 775 612  
 e-mail: [www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)  
[www.biotechlab-s.com.ua](http://www.biotechlab-s.com.ua)