

**НАБОР ИФА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРУ ТТГ
В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА**

4003, T.R.A.

Каталог. № : 4003

Методика от 01-04-2013

Количество : 96

Производитель: **MEDIPAN GMBH**

(Германия)



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

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная тест-система предназначена для количественного иммуноферментного определения специфических антител к рецептору тиреотропного гормона (ТТГ) в человеческой сыворотке. Несмотря на то, что тиреотоксикоз вызывается тиреоидной автономией, гипертиреозидизм при болезни Грейвса обусловлен антителами к рецептору ТТГ, которые имитируют эффект ТТГ на тиреоидные клетки и, таким образом, рост концентрации в крови тироксина и трийодтиронина. Следовательно, измерение антител к рецептору ТТГ является ценным диагностическим маркером для дифференциальной диагностики гипертиреозидизма и последующего наблюдения пациентов с болезнью Грейвса во время и после лечения гипертиреозидизма лекарственными препаратами, йодом J¹³¹ или хирургическими методами.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Medizym® T.R.A. – конкурентный иммуноферментный метод с несколькими последовательными инкубациями. Во время первой инкубации специфические антитела к рецептору ТТГ (TRAb) из образцов сыворотки и стандартов будут связываться с иммобилизованным в ячейках планшета рецептором. После 120-минутной инкубации несвязавшиеся антитела удаляются промывкой. Во второй инкубации длительностью 20 минут ТТГ-комплекс связывается со свободными эпитопами рецептора. Отсутствие антител против ТТГ-рецептора приводит к полному насыщению рецептора ТТГ-комплексом. Следовательно, чем больше антител присутствует в образце, тем в меньшей степени ТТГ-комплекс связывается с иммобилизованным ТТГ-рецептором. Образовавшийся рецептор-ТТГ-комплекс специфически взаимодействует с пероксидазным конъюгатом. После 20-минутной инкубации излишки конъюгата удаляются от связанных с твердой фазой иммунных комплексов промывкой. Пероксидаза хрена при добавлении к бесцветному субстрату 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) превращает его в продукт синего цвета. Ферментная реакция после 20-минутной инкубации останавливается кислым стоп-раствором (серная кислота), при этом цвет раствора меняется на желтый. Оптическая плотность раствора при 450 нм обратно пропорциональна количеству связавшихся специфических антител. Стандартная кривая строится в координатах x-y, где известная концентрация стандартов откладывается на оси x, а оптическая плотность соответствующих стандартов – на оси y. Концентрацию аутоантител к ТТГ в образце оценивают по стандартной кривой.

ОБРАЗЦЫ ПАЦИЕНТОВ

Сбор и хранение образцов

Кровь получают стандартной венепункцией. Сыворотка отделяется от сгустка центрифугированием. Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания сыворотки. Если сыворотка будет анализироваться в нескольких исследованиях, приготовьте аликвоты и храните их при -20 °С.

Подготовка образцов к анализу

Позвольте образцам достичь комнатной температуры перед анализом. Осторожно перемешайте образцы до полной гомогенности. Образцы сыворотки можно хранить неразбавленными 3 суток при 2-8°С, длительное время при -20°С или ниже.

Замечание: Перед анализом, если в этом есть необходимость, удалите из сыворотки любые включения центрифугированием и используйте для анализа только очищенный от частиц супернатант.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА для 96 ОПРЕДЕЛЕНИЙ

A	Микропланшет, 12 8-луночных стрипов (96 ячеек), покрытых мышьяными антителами/ ТТГ-рецептором, упакованы в вакуумный пакет с осушителем	1 планшет
B	Концентрат Промывочного буфера. (x10) на конечный объем 1000 мл	100 мл
G	ТТГ- комплекс, (биотинилированный) лиофилизированный	3 флакона
K	Разбавитель ТТГ- комплекса (буферный раствор). Готов для использования.	1 x 15 мл
D	Конъюгат SA-POD (на 15 мл) Концентрат	1 x 0,75 мл
J	Разбавитель конъюгата Готов для использования	1 x 15 мл
E	Субстрат ТМБ 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин в цитратном буфере, содержит перекись водорода. Готов для использования	1 x 15 мл
F	Стоп-реагент 0,25 М серная кислота. Готов к использованию. Предосторожности: раздражающее вещество	1 x 10 мл
H	Инкубационный буфер Готов для использования	10 мл
1-4	Калибраторы Т.Р.А. (Сыворотка) Концентрации указаны во вкладыше. Готовы для использования	1,0 мл каждый
CI – II	Контроли (Сыворотка) Концентрации указаны во вкладыше. Готовы для использования	1,0 мл каждый

Необходимые, но не поставляемые материалы

- Полуавтоматическая пипетка на 10 – 100, 100 - 1000 мкл
- Многоканальная пипетка на 50-200 мкл
- Автоматический микропланшетный вошер
- Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450 нм или на двух длинах волн 620 или 690 нм
- Горизонтальный шейкер
- Градуированные цилиндры
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Вортекс
- Плёнка для заклеивания планшетов

Состав и хранение

Medizym® T.R.A предназначен для 96 определений. Этого количества достаточно для определения 42 неизвестных образцов вместе со стандартами и контролями в дублях. Срок годности каждого реагента указан на этикетке набора. Все реагенты тест-системы должны храниться в холодильнике при 2-8°С в оригинальной упаковке.

Подготовка к анализу

Образцы сыворотки и реагенты перед анализом должны быть доведены до комнатной температуры. Перемешайте реагенты осторожным переворачиванием. Набор включает рамку для стрипов. Перед вскрытием позвольте всем упакованным стрипам достичь комнатной температуры в течение, по крайней мере, 30 минут.

A Микропланшет

Выберите необходимое для анализа количество покрытых ячеек. Верните лишние ячейки в закрывающийся пакет с осушителем. Пакет должен быть плотно закрыт и защищен от влаги. При правильном хранении лунки во вскрытом пакете можно хранить при 2-8°С до 6 месяцев.

B Промывающий буфер

Раствор Промывающего буфера готовится 10-кратным разбавлением деионизированной водой. Например, 50 мл концентрата смешайте с 450 мл дистиллированной воды для одного стрипа. Перед разбавлением концентрата раствора растворите имеющиеся кристаллы нагреванием при 37°С. Готовый Промывающий буфер стабилен 30 дней при 2-8°С.

G ТТГ- комплекс

Растворите каждый флакон в 4,5 мл Разбавителя ТТГ-комплекса (Реагент K). Оставшийся после анализа реконституированный ТТГ- комплекс можно хранить при 2-8°С до 20 недель. Объедините аликвоты раствора ТТГ-

комплекса, если будет использоваться объем больше 1 флакона.

D Раствор ферментного конъюгата (конъюгат SA-POD)

21-кратный концентрат конъюгата должен быть разбавлен в соотношении 1 часть концентрата конъюгата фермента к 20 частям Разбавителя конъюгата (Реагент J) в соответствии с количеством используемых ячеек до использования.

Например, разбавьте 0,5 мл концентрата SA-POD 10 мл Разбавителя конъюгата = 10,5 мл Рабочего раствора конъюгата. Если будет использован целый планшет, необходимо 96x100 мкл = 9,6 мл Рабочего раствора конъюгата.

Готовый Рабочий раствор конъюгата стабилен 4 недели при 2-8°C.

E Субстрат ТМБ

Избегайте воздействия света!

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- Используйте правильно приготовленные образцы сыворотки
- Рекомендуется использование дублей

- Добавьте по 50 мкл Инкубационного буфера (H) во все ячейки
- Добавьте по
 - 100 мкл Контроля (C1)
 - 100 мкл Стандартов (1-4)
 - 100 мкл Контроля (CII)
 - 100 мкл Подготовленных образцовв дублях в соответствующие ячейки. Встряхивайте стрипы в течение 5 сек.
- Закройте планшет плёнкой и инкубируйте планшет 120 минут при комнатной температуре при сильном встряхивании (>500 об/мин). Удлинение времени инкубации до 160 минут улучшит точность стандартной кривой. Без встряхивания время инкубации должно быть, по крайней мере, 180 минут.
- Полностью удалите содержимое ячеек встряхиванием и удалите остатки жидкости в стрипах, прижав их к фильтровальной бумаге. Промойте ячейки 1 раз 300 мкл/ячейку разведённым Промывочным буфером (B), встряхивая ячейки с буфером в течение 5 секунд.
- Добавьте по 100 мкл реконституированного ТТГ- комплекса (приготовленного из реагентов G и K) в каждую ячейку. Встряхивайте стрипы в течение 5 сек.
- Закройте планшет плёнкой и инкубируйте планшет 20 минут при комнатной температуре.
- Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки как указано в п.4 настоящего протокола.
- Добавьте по 100 мкл Рабочего раствора Конъюгата (приготовленного из реагентов D и J) в каждую ячейку. Встряхивайте стрипы в течение 5 сек.
- Закройте планшет плёнкой и инкубируйте планшет 20 минут при комнатной температуре.
- Полностью удалите содержимое ячеек, стряхните остатки жидкости на фильтровальную бумагу и промойте ячейки 3 раза 300 мкл/ячейку разведённым Промывочным буфером (B), встряхивая ячейки с буфером в течение 5 секунд в каждом цикле промывки.
- Добавьте по 100 мкл субстрата (E) в каждую ячейку. Встряхивайте стрипы в течение 5 сек.
- Закройте планшет плёнкой и инкубируйте планшет 20 минут в темноте при комнатной температуре.
- Добавьте по 50 мкл Стоп-реагента (F) в каждую ячейку в той же последовательности и с той же скоростью, что и Субстрат. Перемешайте осторожно.
- Считайте результаты в планшетном фотометре на длине волны 450 нм против 620 или 690 нм в течение 20 минут после добавления стоп-раствора.

Замечание: Процедура промывки критична для качества анализа. Некачественная промывка приведет к снижению точности и ложному завышению оптической плотности при измерении результатов.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитайте средние значения поглощения для каждого Стандарта (1-4) и для негативного контроля C1, отложите значения по оси ординат (ось y) и постройте калибровочную кривую для них против концентрации стандартов, отложенных на оси абсцисс (ось x) Рассчитайте концентрации антител к рецептору ТТГ контролей и неизвестных образцов по стандартной кривой в МЕ/л (WHO NIBSC 90/672). Типичный график показан ниже. При автоматизированном расчёте может использоваться график с сигмоидной /4-параметрической аппроксимацией.

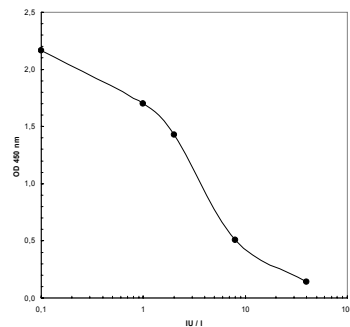
ПРИМЕР ТИПИЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Образец	OD (a)	OD (b)	OD (среднее)	МЕд/л
Контроль I	2,225	2,105	2,165	0,1
Стандарт 1	1,724	1,675	1,700	1
Стандарт 2	1,411	1,443	1,427	2
Стандарт 3	0,520	0,489	0,505	8
Стандарт 4	0,145	0,135	0,140	40
Контроль II	1,146	1,051	1,099	2,9

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: вышеприведенные данные приведены только в качестве примера и не должны быть использованы вместо данных, полученных в лаборатории, потому что они могут меняться от лота к лоту (смотрите вкладыш к набору).

Стандарты данного набора калиброваны строго (1:1) в соответствии с Международным Стандартом ВОЗ NIBSC90/672.

ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ



Критерии достоверности теста

Образцы с оптической плотностью ниже Стандарта 4 следует разбавить и проанализировать повторно. Полученный в повторном анализе результат умножьте на фактор разбавления.

ДИАПАЗОН ОЖИДАЕМЫХ ЗНАЧЕНИЙ

Medizym® T.R.A.	МЕд/л
Отрицательный	≤1
Серая зона	>1-1,5
Положительный	> 1,5

Образцы, для которых полученные результаты оказались в «серой зоне», следует проанализировать повторно.

Рекомендуется каждой лаборатории установить собственные нормальные и патологические диапазоны значений для сывороточных уровней анти - ТТГ- рецептор антител, как это обычно принято также для других диагностических параметров. Поэтому вышеупомянутые данные могут быть использованы только в качестве ориентировочных.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Линейность Medizym® T.R.A.

Образцы были разведены человеческой сывороткой, не содержащей ТТГ, и проанализированы. Полученные значения образцов соответствовали ожидаемым теоретическим значениям Medizym® T.R.A.

За счёт гетерогенности естественных антител, присутствующих в популяции, и эпитопной специфичности и аффинности аутоантител в некоторых случаях возможны исключения.

Специфичность

Человеческий ТТГ до уровня до 100 МЕд/л не оказывает никакой перекрёстной активности на результаты анализа Medizym® T.R.A.

Чувствительность

Нижний предел измерения или аналитическая чувствительность (0+3 S.D.) для набора Medizym® T.R.A составила 0.5 МЕд/л.

В настоящее время так называемая функциональная чувствительность любого метода есть наиболее подходящее и основанное на статистических закономерностях определение нижнего предела обнаружения этим методом.

Эта функциональная чувствительность метода в целом есть концентрация, которая совпадает с 10% (внутрисерийным) и с 20% (межсерийным) коэффициентом вариации в соответствующих профилях воспроизводимости метода в нижнем диапазоне

концентраций. Точно и тщательно измеренное значение функциональной чувствительности для набора Medizym® T.R.A составило **0.8 МЕд/л**.

Значения Medizym® T.R.A. ниже порога функциональной чувствительности не соответствуют статистическим критериям достоверности GLP (критериям хорошей лабораторной практики) и поэтому не могут быть различимы с нулевым значением со статистически удовлетворительной достоверностью. Концентрации Medizym® T.R.A. более чем 0.8 МЕд/л однако, удовлетворяют этим критериям и, следовательно, оцениваются как действительные.

Внутри и межсерийная воспроизводимость

Внутри серии (n = 12)			Между сериями (n = 5)		
Образцы, №	Ср. конц. (МЕд/л)	CV (%)	Образцы, №	Ср. конц. (МЕд/л)	CV (%)
1	0,6	13	5	0,2	39
2	1,4	6	6	2,8	6
3	2,8	6	7	4,1	9
4	14,0	4	8	13,7	12

Для пациентов с болезнью Грейвса cut-off составил 1,5 МЕд/л с чувствительностью 95% и специфичностью 100%.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Здоровые лица должны иметь отрицательный результат в анализе Medizym® T.R.A. Однако некоторые предположительно здоровые лица на самом деле оказываются сероположительными.

Любые клинические диагнозы не могут быть основаны только на результатах диагностических методов *in vitro*.

Подразумевается, что врач рассматривает все клинические и лабораторные результаты в совокупности для постановки диагноза.

КРАТКАЯ СХЕМА Medizym® T.R.A

	Действие и реагент	Объём
1.	Добавьте Инкубационный буфер (H)	50 мкл
2.	Добавьте Стандарты (1-4) Контроль CI Контроль CII Подготовленные образцы	100 мкл 100 мкл 100 мкл 100 мкл
3.	Инкубируйте планшет 120 минут при комнатной температуре при сильном встряхивании (>500 об/мин)	
4.	Промойте ячейки и удалите Промывающий раствор (приготовленный из реагента B)	1 x 300 мкл
5.	Добавьте реконституированный ТТГ-комплекс (приготовленный из реагентов G и K)	100 мкл
6.	Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре*	
7.	Промойте ячейки и удалите Промывающий раствор	1 x 300 мкл
8.	Добавьте Рабочий раствор Конъюгата (приготовленный из реагентов D и J)	100 мкл
9.	Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре*	
10.	Промойте ячейки и удалите Промывающий раствор	3 x 300 мкл
11.	Добавьте субстрат (E)	100 мкл
12.	Инкубируйте 20 минут в темноте при комнатной температуре*	
13.	Добавьте Стоп-реагент (F)	50 мкл
14.	Считайте результаты на длине волны 450 нм против 620 или 690 нм в течение 20 минут	

- Используйте для анализа только чистую сыворотку (если в этом есть необходимость, удалите из сыворотки любые включения центрифугированием).

* После внесения реагентов и перед любой инкубацией встряхивайте планшет в течение 5 секунд.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики *in vitro*, аккуратно выполняйте настоящую инструкцию. Настоящая инструкция предназначена только для данного набора в данной комплектации. Замена единичных компонентов не согласуется с регламентом CE.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетках. То же правило касается стабильности, заявленной для растворенных/разведенных реагентов.
- Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов.
- Не используйте реагенты от других производителей

- Пипетируйте все реагенты без задержки и с одинаковой скоростью.
- Все реагенты храните при температуре 2-8°C в оригинальной упаковке.
- Некоторые из реагентов содержат небольшие количества (<1% v/w) азида натрия в качестве консерванта. Избегайте попадания реагентов внутрь и контакта с кожей или слизистыми.
- Исходные продукты, полученные из материалов человеческого происхождения, были проверены и найдены отрицательными на HbsAg, HIV и HCV-антитела. Однако, так как никакие известные методы не гарантируют отсутствия инфекционных агентов, обращайтесь с всеми компонентами и образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
- Так как набор содержит потенциально инфекционно опасные материалы, должны соблюдаться следующие предосторожности:
 - нельзя курить, есть или пить в помещении, где используется набор
 - всегда используйте защитные перчатки
 - никогда не пипетируйте ртом
 - вытирайте пятна быстро, тщательно обрабатывая испачканную поверхность дезсредствами.
- Строго следуйте настоящей инструкции.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
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