



Набор ИФА для определения РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПИНА 3-го поколения

Кат. № : KT27IW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 10-2007
Версия 3

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

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор рецептора тиреотропина 3-го поколения предназначен для использования квалифицированным персоналом только для количественного определения аутоантител рецептора тиреотропина в человеческой сыворотке.

Гипертиреоз при болезни Грейвса вызывается наличием аутоантител рецептору тиреотропина (TSHR), а измерение этих аутоантител (TRAb) может быть полезно при диагностике и лечении болезни.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

В наборе рецептора тиреотропина 3-го поколения, аутоантитела рецептора тиреотропина в сыворотках пациентов, калибраторах и контролях взаимодействуют с рецептором тиреотропина, нанесенного на лунки планшета ИФА. После 2 часов инкубации образцы удаляются, оставляя TRAb, связанное с иммобилизованным рецептором. Во втором этапе инкубации добавляется человеческое моноклональное аутоантитело к TSHR, меченное биотином (M22-биотин), где оно взаимодействует с иммобилизованными рецепторами тиреотропина, которые не были блокированы связанными TRAb. После этого количество M22-биотина, связанного с планшетом, определяется в третьем этапе инкубации путем добавления пероксидазы стрептавидина, которая связывается определенно с биотином. Избыток несвязанной пероксидазы стрептавидина затем смывается, и добавление субстрата тетраметилбензидина (TMB) ведет к образованию синего цвета. Эта реакция останавливается добавлением стоп раствора, превращая содержимое лунок из синего цвета в желтый. Затем абсорбция желтой реакционной смеси считывается на планшетном считывателе ИФА при 450 нм. Более низкая абсорбция указывает на наличие TRAb в исследуемом образце (так как TRAb замедляет закрепление M22-биотина на лунках планшета, покрытых TSHR).

РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

Хранить нераспакованные наборы и их компоненты при 2-8°C.

- **МИКРОПЛАНШЕТ:** 12 делимых стрипов из 8 лунок (всего 96) в рамке и герметичном мешочке из фольги. Оставьте при комнатной температуре по крайней мере на 20 минут перед вскрытием. Вставьте требуемое количество стриповых лунок в поставляемую рамку. После вскрытия, верните любые неиспользованные лунки в исходный пакет из фольги и герметично закройте изоляционной пленкой. Поместите мешочек из фольги в в самозапечатывающийся полиэтиленовый пакет с осушителем внутри и храните при 2-8°C до 12 недель.
- **НАЧАЛЬНЫЙ БУФЕР:** 1 флакон (10 мл). Готовый к использованию.
- **КАЛИБРАТОРЫ:** 5 калибраторов (1,0 мл каждый). Концентрации: 0,4, 1,0, 2,5, 10 и 30 МЕ/л (откалиброваны согласно с NIBSC 90/672 ВООЗ). Готовы к использованию.
- **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ:** 1 флакон (1,0 мл). См. диапазон концентрации на внешней этикетке. Готовы к использованию.
- **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ:** 1 флакон (1,0 мл). Готовы к использованию.
- **M22-БИОТИН:** 1 флакон (15 мл). Готовы к использованию.
- **КОНЬЮГАТ 20x:** 1 флакон (0,75 мл) содержащий стрептавидин-пероксидазу. Разбавьте 1:20 разбавителем конъюгата (напр.,

0,5 мл + 9,5 мл). Хранить при 2-8°C до окончания срока годности набора.

- **РАЗБАВИТЕЛЬ КОНЬЮГАТА:** 1 флакон (15 мл) буфера для разбавления конъюгата. Готовый к использованию.
- **СУБСТРАТ TMB:** 1 флакон (15 мл) тетраметилбензидина (TMB). Готовый к использованию.
- **КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ ПРОМЫВОЧНЫЙ РАСТВОР:** 1 флакон (100 мл) 10x концентрированного буфера. Перед использованием разбавить до 1 л дистиллированной водой. Хранить при 2-8°C до окончания срока годности набора.
- **СТОП РАСТВОР:** 1 флакон (10 мл) 0,5 M H₂SO₄. Готовый к использованию.
- **Самоклеющаяся пленка.**
- **Полиэтиленовый пакет.**

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Пипетки для распределения 50, 75, 100 мкл и соответствующие объемы для разбавления конъюгата.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Микропланшетный шейкер, установленный на 500 встряхиваний/мин. (не орбитальный).
- Микропланшетный спектрофотометр на 96 лунок и с измерением абсорбции при 450 нм.

5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфичные реагенты из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре, это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Недостаточная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить

денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.

- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пейте, не курите, не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Используемые для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

ХРАНЕНИЕ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

Исследуемые сыворотки должны анализироваться вскоре после отделения или отданы на хранение, предпочтительно в определенных количествах, при или ниже -20°C. 150 мкл достаточно для одного анализа (двойное определение на 75 мкл рекомендуется). Повторного замораживания и размораживания или увеличения температуры хранения нужно избегать. Неправильное хранение серологических образцов может привести к потере активности TRAb. Не использовать липемическую или гемолизированную сыворотку или образцов, содержащие макроастицы. Не используйте плазму в анализе. При необходимости разморозьте исследуемые образцы при комнатной температуре и осторожно смешайте, чтобы обеспечить однородность.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед использованием позвольте всем реагентам находится при комнатной температуре (20-25°C) по крайней мере 30 минут.

1. Раскапайте по 75 мкл начального буфера в каждую используемую лунку.
2. Раскапайте по 75 мкл калибраторов, контролей и исследуемых сывороток в соответствующие лунки. Используйте первую лунку в качестве бланка.
3. Накройте рамку и встряхивайте лунки в течении 2 часов при комнатной температуре (20-25°C) на планшетном шейкере ИФА (500 встряхиваний/мин.).
4. Аспирируйте содержимое лунок с помощью промывочного аппарата для планшета или резко удалите жидкость, перевернув рамку со стрипованными лунками на соответствующую поверхность. Один раз промойте лунки, добавив разбавленный промывочный раствор, и аспирируйте раствор с помощью промывочного аппарата для планшета или резко удалите жидкость, перевернув рамку со стрипованными лунками на соответствующую поверхность. Осторожно постучите перевернутыми лунками о чистую, сухую промокательную поверхность, чтобы удалить избыток промывочного раствора (только при ручной промывке планшета).
5. Раскапайте 100 мкл M22-биотина в каждую лунку (кроме бланка). Избегайте разбрызгивания материала из лунок в процессе добавления.
6. Накройте планшет и инкубируйте при комнатной температуре в течении 25 минут без встряхивания.
7. Повторите промывку согласно п. 4.
8. Раскапайте 100 мкл разбавленного конъюгата в каждую (кроме бланка) и инкубируйте при комнатной температуре в течении 20 минут без встряхивания.
9. После инкубации удалите образцы резко перевернув рамку со стрипованными лунками на соответствующую поверхность. Два раза промойте лунки разбавленным промывочным раствором и один раз дистиллированной водой (для удаления пены) и осторожно постучите перевернутыми лунками о чистую, сухую промокательную поверхность, чтобы удалить избыток

промывочного раствора (при использовании промывочного аппарата планшет можно промыть 3 раза только разбавленным промывочным раствором).

10. Раскапайте 100 мкл субстрата TMB в каждую лунку и инкубируйте в темноте при комнатной температуре в течении 30 минут без встряхивания.
11. Раскапайте 50 мкл стоп раствора в каждую лунку и встряхивайте планшетом бриблиз. 5 сек. на шейкере. Обеспечьте одинаковое время инкубации субстрата для каждой лунки.
12. Считайте абсорбцию каждой лунки при 450 нм с помощью планшетного считывателя ИФА. настроенного по отношению к лунке только с 100 мкл субстрата TMB и 50 мкл стоп раствора.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

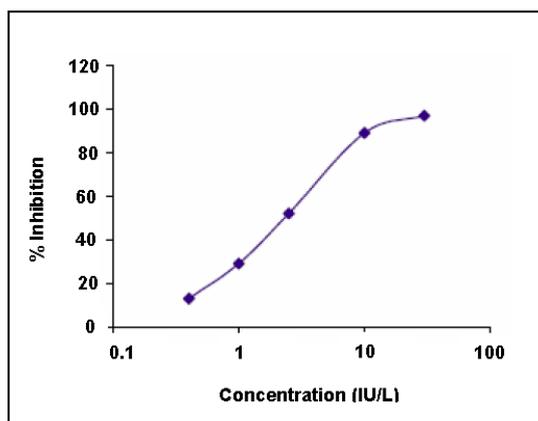
Калибровочная кривая может быть установлена изображением концентрации калибратора на оси X (логарифмическая шкала) против абсорбции калибраторов на оси Y (линейная шкала). Концентрации TRAb в сыворотках пациентов могут тогда считываться с калибровочной кривой. Могут использоваться другие системы обработки данных. Результаты могут также быть выражены как ингибирование (% I) закрепления M22, рассчитываемого с использованием формулы:

$$100 \times (1 - \frac{\text{абсорбция исследуемого образца при 450 нм}}{\text{абсорбция отрицательного контроля при 450 нм}})$$

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Образец	Абсорбция при 450 нм (без бланка)	% I	МЕ/л
Отриц. контроль	2.290		
КАЛ 1	1.987	13	0.4
КАЛ 2	1.618	29	1
КАЛ 3	1.108	52	2.5
КАЛ 4	0.261	89	10
КАЛ 5	0.079	97	30
Полож. контроль	1.488	35	1.3

Указанные выше данные должны рассматриваться как пример и не должны использоваться для вычисления действительных данных.



ПОРОГ (cut-off) АНАЛИЗА

Порог:	МЕ/л
Отрицательный:	<0.4 МЕ/л
Положительный:	≥0.4 МЕ/л

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клиническая специфичность

На данном наборе исследовались 141 образец здоровых доноров. Все 141 оказались отрицательными к аутоантителам TSHR.

Клиническая чувствительность

Анализировались 108 образцов от пациентов с болезнью Грейвса (проходившие и не проходившие лечение), и 103 (95 %) оказались положительными к аутоантителам TSHR.

Нижний предел чувствительности

Отрицательный контроль набора испытывался 50 раз и рассчитывалось среднее и среднеквадратичное отклонение. Нижний предел чувствительности в +2 среднеквадратичных отклонениях составил 0.08 МЕ/л.

Точность между анализами (воспроизводимость)

Образец	МЕ/л (к-во = 25)	КВ (%)
1	4.2	7.9
2	1.7	8.1

Точность в анализе (повторяемость)

Образец	МЕ/л (к-во = 24)	КВ (%)
1	0.8	7.5
2	13.4	3.8

Клиническая точность

Анализ сывороток пациентов с отличающимися от болезни Грейвса аутоиммунными болезнями не указал никакой интерференции аутоантител с тиреоглобулином, пероксидазой щитовидной железы, глутаминовой кислоты, декарбоксилазой, 21-гидроксилазой, рецептором ацетилхолина, дсДНК или ревматоидным фактором.

Интерференция

Никакой интерференции не наблюдалось при насыщении образцов следующими материалами: гемоглобином до 5 мг/мл, билирубином до 0.2 мг/мл, человеческим ЛГ до 10 Е/мл, ХГЧ до 160 Е/мл, человеческим ФСГ до 70 Е/мл и человеческий ТСГ до 3 Е/л.

Данные, указанные в этих инструкциях должны использоваться только для примера. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория включала свою собственную панель контрольных образцов в анализе. Каждая лаборатория должна установить свой собственный референтный диапазон нормы и патологии для уровней TRAb.

АВТОМАТИЧЕСКОЕ ИСПЫТАНИЕ

- Это испытание может использоваться с автоматическим аппаратом для наборов ИФА на микропланшете.
- Мы гарантируем его применение на автоматических аппаратах RADIM и-или SEAC.
- При использовании автоматического аппарата не RADIM или SEAC конечный пользователь несет ответственность за правильность исследования наборов ИФА

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: (0342) 77 51 22;
тел./факс: (0342) 77 56 12
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua