

НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРАМ ТТГ

EIA-3369, TSH Receptor Autoantibody ELISA

Каталог. № : EIA-3369
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 10-2013
Версия 12.0



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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор для твердофазного иммуноферментного анализа Антитела к рецепторам ТТГ предназначен для профессионального использования для количественного определения антител к рецепторам ТТГ в сыворотке.
Гипертиреозидизм при болезни Грейвса связан с присутствием антител к рецепторам ТТГ. Измерение этих антител может быть полезно для постановки диагноза и в ведении больного.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Антитела к рецепторам ТТГ сыворотки пациента, калибраторов и контролей взаимодействуют с рецепторами ТТГ, иммобилизованными на лунках микропланшета. После инкубации в течение 2 часов образцы удаляются, за исключением Ат к рецепторам ТТГ, связанных с иммобилизованными рецепторами ТТГ. Перед второй инкубацией в лунки добавляется биотинилированный ТТГ, во время второй инкубации биотин взаимодействует с иммобилизованными рецепторами ТТГ, не связанными с антителами к рец. ТТГ образцов пациентов, калибраторов и контролей. Количество биотина, связанного с твердым носителем, затем определяется в ходе третьей инкубации со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой, который специфично связывается с биотином. Несвязанный стрептавидин затем удаляется промывкой, после чего в лунки добавляется тетраметилбензидин, в результате чего формируется голубое окрашивание. Эта реакция останавливается добавлением стоп-раствора, после чего голубое окрашивание меняется на желтое. Абсорбция желтой реакционной смеси измеряется на спектрофотометре для микропланшетов при длине волны 450 нм. Более низкая абсорбция означает присутствие Ат к рецепторам ТТГ в образце, т.к. Ат к рец. ТТГ ингибируют связывание биотина ТТГ с рецепторами ТТГ, нанесенными на лунки микропланшета.

4. ХРАНЕНИЕ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

- Образцы сыворотки необходимо исследовать вскоре после отделения или хранить при температуре не выше -20°C, желательно в аликвотах.
- 150 мкл достаточно для одного исследования (дублированные 75 мкл определения рекомендуются).
- Не допускать повторного замораживания/оттаивания сывороток.
- Не допускать повышения температуры хранения сывороток.
- Неправильное хранение образцов сыворотки может привести к частичной потере активности Ат к рецепторам.
- Не использовать гиперлипидные или гемолизированные образцы сыворотки.
- Не использовать плазму в качестве образца.
- При необходимости (исследования) разморозить сыворотку и аккуратно смешать до однородной консистенции.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- дозаторы на 50 мкл, 75 мкл и 100 мкл
- мерная посуда
- очищенная вода
- спектрофотометр для ELISA- планшетов, с возможностью измерения при 450нм
- шейкер для ELISA-планшетов, на 500 встряхиваний в мин. (НЕ орбитальный).
- средство для накрытия плашки

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ, ВХОДЯЩИХ В НАБОР

Храните невскрытые наборы и все компоненты при 2 – 8 °С

1.	A	Микролунки с нанесенными рецепторами ТТГ – 12 разламываемых стрипов по 8 лунок (96 всего) в держателе, упакованные в фольгированный пакет с замком. Выдержать 30 минут при комнатной температуре перед открыванием. Прочно закрепить лунки в поставляемом держателе. Неиспользуемые лунки положить в фольгированный пакет, поставляемый с набором и герметично закрыть. Затем положить фольгированный пакет в ПЭ пакет с замком. В ПЭ пакет также положить влагопоглотитель. Хранить при 2-8°C до 6 мес.
2.	B	Стартовый буфер , 10 мл, готов к использованию
3.	C1 - 4	Стандарты (калибраторы) 1, 2, 8 и 40 Ед/л (Единицы соответствуют стандарту NIBSC 90/672) 4 × 1.0 мл, готов к использованию.
4.	D1	Отрицательный контроль , 1.0 мл, готов к использованию
5.	D2	Положительный контроль (диапазон указан на этикетке флакона) 1.0 мл, готов к использованию
6.	E	Биотинилированный ТТГ , 3 × 4.5 мл, лиофилизат; восстановить каждый флакон 4.5мл буфером для восстановления биотинилированного ТТГ. Если необходимо использовать более одного флакона, смешать содержимое всех флаконов перед использованием. Хранить при 2 – 8°C до 10 месяцев после восстановления.
7.	F	Буфер для восстановления биотинилированного ТТГ , 15 мл, готов к использованию
8.	G	Стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой (SAPOD) , 1 × 0.75 мл. Концентрат. Развести 1 к 20 разбавителем для SAPOD. Например, 0.5 мл + 9.5 мл. Хранить при 2 – 8°C до даты срока годности набора.

9.	H	Разбавитель для стрептавидин-пероксидазы , 15 мл, готов к использованию
10.	I	Субстрат пероксидазы (ТМБ) , 15 мл, готов к использованию
11.	J	Концентрат промывочного раствора , 100 мл. Развести в 1 литре чистой воды перед использованием. Хранить при 2 – 8°C до даты срока годности набора.
12.	K	Стоп-раствор , 10 мл, готов к использованию

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Выдерживать реагенты и образцы при комнатной температуре (20-25°C) не менее 30 минут.

Для этапов 1, 5, 8, 10 и 11 рекомендуется использовать повторительную пипетку типа Eppendorf.

1. Внести по **75 мкл стартового буфера (В)** в каждую лунку, оставив одну лунку пустой для бланка (см. этап 12).
2. Внести по **75 мкл образцов пациентов, калибраторов** (реагенты С1-4) и **контролей** (реагенты D1 и D2) в соответствующие лунки (начать с 40 Е/л калибратора, затем калибраторы с более низкой концентрацией, затем положительный, отрицательный контроли, затем образцы пациентов), одну лунку для бланка оставить пустой.
3. Накрывать микропланшет и поставить на шейкер на **2 часа** при комнатной температуре. Использовать шейкер для микропланшетов (500 встряхиваний в мин.).
4. После инкубации удалить содержимое лунок с помощью промывающего устройства или вытряхнуть, перевернув планшет. Промыть лунки **1 раз разбавленным промывочным раствором (реагент J)**, удалить содержимое лунок, используя промывающее устройство, или вытряхнув на впитывающий материал. Слегка постучать перевернутыми лунками по чистой и сухой впитывающей поверхности для удаления остатков жидкости (только в случае ручной промывки).
5. Внести по **100 мкл восстановленного биотина–ТТГ** (реагент Е) в каждую лунку (кроме лунки для бланка). Избегать расплескивания материала при внесении реактивов в лунки.
6. Накрывать микропланшет и инкубировать при комнатной температуре **25 минут** без встряхивания.
7. Повторить этап 4.
8. Внести по **100 мкл разбавленного стрептавидина конъюгированного с пероксидазой** (реагент G) в каждую лунку кроме лунки для бланка и инкубировать при комнатной температуре 20 минут без встряхивания.
9. После инкубации, удалить образцы, резко вытряхнув содержимое лунок в соответствующую емкость. Промыть лунки дважды разбавленным промывочным раствором (реагент J). Затем один раз промыть чистой водой (для удаления пены) и аккуратно постучать перевернутыми лунками по чистой и сухой впитывающей поверхности, чтобы удалить избыток промывочного раствора (если используется промывающее устройство, микропланшет можно промыть три раза только разбавленным промывочным раствором (реагент J)).
10. Внести по **100 мкл ТМБ** (реагент I) в каждую лунку (в т.ч. для бланка) и инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут без встряхивания.
11. Внести по **50 мкл стоп-раствора** (реагент K) в каждую лунку (в т.ч. бланк) и поставить на шейкер на 5 секунд. **Время инкубации с субстратом должно быть одинаковым для каждой лунки!!!**
12. Считать абсорбцию каждой лунки при 450нм на спектрофотометре для ELISA- планшетов. Настроить спектрофотометр на ноль по бланк-лунке, содержащей только **100 мкл ТМБ** и 50 мкл стоп раствора.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Построить калибровочную кривую, отложив концентрации калибраторов по оси X (log масштаб) напротив значений абсорбции калибраторов на оси Y (линейный масштаб).

Концентрации Ат к рецепторам ТТГ образцов пациентов можно считать с калибровочной кривой, в т.ч. с использованием программного обеспечения для обработки данных.

Результат можно также представить в виде ингибирования связывания ТТГ (в %), рассчитанного по следующей формуле:

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{абсорбция образца при 450 нм}}{\text{абсорбция отрицательного контроля (D1) при 450 нм}} \right]$$

Образцы с высокими концентрациями Ат РТ можно развести отрицательным контролем (D1). Например, 20 мкл образца плюс 180 мкл отрицательного контроля дадут 10тикратное разведение. Другие разведения можно приготовить из 10тикратного разведения или другим подходящим способом. Некоторые сыворотки не разбавляются линейным путем, и мы предлагаем, чтобы разведение, дающее значения 50% снижения, использовались для подсчета концентрации.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

!!! приводятся только в качестве примера, не для использования при расчете фактических результатов!!!

Образец	A450 (минус бланк)	%I	Ед/л
Отрицательный контроль	2,00	0	0
С1	1,70	15	1
С2	1,50	25	2
С3	0,65	68	8
С4	0,15	93	40
Положительный контроль	1,26	37	3,5

РАЗГРАНИЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ (ПОГРАНИЧНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ (CUT-OFF))

Cut off	Ед/л
Отрицательный	≤ 1 Ед/л
Сомнительный	1.1 – 1.5 Ед/л
Положительный	> 1.5 Ед/л

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клиническая специфичность

154 образца здоровых доноров исследовались с помощью набора TRAb ELISA . 99% дали отрицательный результат на присутствие Ат к рецепторам ТТГ.

Клиническая чувствительность

50 образцов пациентов с диагнозом болезнь Грейвса были исследованы с использованием набора TRAb ELISA. 49 (98%) дали положительный результат на присутствие Ат к рецепторам ТТГ . 1 образец (2%) дал сомнительный результат.

Функциональная чувствительность

Междутестовый контроль (Ед/л) показал коэффициент вариации 20% при конц. 0.60 Ед/л.

Минимальная определяемая концентрация:

Отрицательный контроль набора был исследован 32 раза с расчетом стандартного отклонения. Минимальная определяемая концентрация при +2 стандартном отклонении составила 0.21 Ед/л.

КЛИНИЧЕСКАЯ ПРАВИЛЬНОСТЬ

Анализ сывороток пациентов с аутоиммунными заболеваниями, кроме болезни Грейвса, не выявил влияния на результат Ат к тиреоглобулину, ТПО, декарбоксилазе глютаминовой кислоты, 21-гидроксилазы, ацетилхолиновых рецепторов; двухспиральной ДНК или ревматоидного фактора.

Интерференция

Не влияют на результат:

Гемоглобин до 5 мг/мл; билирубин до 0.2 мг/мл;

ЛГ человека до 10 Ед/мл; ХГч до 160 Ед/мл;

ФСГ человека до 70 Ед/мл, ТТГ человека до 30 Ед/л.

Данные, приведенные в данной инструкции, должны использоваться только как ориентировочные. Каждой лаборатории рекомендуется использовать собственный контрольный материал при постановке анализа. Каждая лаборатория должна установить собственные нормальные и патологические значения уровней Ат к рецепторам ТТГ.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Данный набор предназначен только для профессиональных in-vitro исследований!
- Строго соблюдайте инструкцию.
- Строго соблюдать сроки годности, указанные на этикетках, и сроки стабильности восстановленных реактивов.
- Более подробная информация по безопасности указана в паспорте данных безопасности.
- Материалы человеческого происхождения, используемые в данном наборе, были предварительно протестированы и показали отрицательный результат на ВИЧ1 и 2 и гепатиты. Однако при работе с любыми реактивами, содержащими компоненты человеческой крови, в том числе с тестируемыми образцами, их следует рассматривать как потенциально инфицированный материал.
- В случае загрязнения рук реагентами – тщательно вымыть руки перед уходом из лаборатории.
- Перед утилизацией все потенциально инфицированные отходы, в том числе образцы пациентов.
- Материал животного происхождения был получен от здоровых животных, однако следует обращаться с реактивами животного происхождения как с потенциально инфицированными. – Некоторые компоненты содержат небольшие количества азиды натрия в качестве консерванта.
- Все компоненты набора: не глотать, избегать вдыхания, попадания в кровоток, а так же избегать контакта с кожей, глазами и одеждой.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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