

НАБІР РЕАГЕНТІВ

РЕЦЕПТОР ТСГ (ТИРЕОТРОПТИЙ СТИМУЛЮЮЧИЙ ГОРМОН) ELISA

TSH Receptor Autoantibody ELISA

Каталог. №: **EIA-3369**

Дата випуску інструкції: **2021-01-11**
Версія: **15.0**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір ІФА Рецептор ТСГ (TSHR) аутоантитіло (TRAb) призначений для професійного використання для кількісного визначення антитіл до рецепторів TRAb у людській сироватці.

Гіпертиреозидизм при хворобі Грейвса пов'язаний з присутністю антитіл до рецепторів ТСГ і вимірювання цих антитіл може бути корисним при встановленні діагнозу та лікуванні хворого.

2. ПОСИЛАННЯ/ЛІТЕРАТУРА

1. J. Bolton et al
Measurement of thyroid stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA Clin. Chem 1999 45: 2285-2287
2. K. Kamijo TSH receptor antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto's thyroiditis: a comparison of two two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH receptor and coated tube radioassay using human recombinant TSH receptor Endocrine Journal 2003 50:113-116
3. B. Rees Smith et al A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies Thyroid 2004 14: 830-835

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

У TRAb ELISA, TRAb у сироватках пацієнтів дозволяють взаємодіяти калібраторам та контролям із TSHR, нанесеним на лунки планшетів ІФА. Після 2-годинної інкубації зразки викидають, залишаючи TRAb, зв'язаний з іммобілізованим TSHR. TSH Біотин додають на другому етапі інкубації, де він взаємодіє з іммобілізованим TSHR, який не блокується зв'язаним TRAb із сироватками пацієнта, калібраторами або контролями. Кількість TSH біотину, зв'язаного з пластиною, визначають на третьому етапі інкубації, шляхом додавання стрептавідину, кон'югованого з пероксидазою (SA-POD), який специфічно зв'язується з Біотином. Незв'язаний стрептавідин SA-POD потім видаляється шляхом промивання, а після додавання субстрату пероксидази тетраметилбензидину (ТМВ) призводить до утворення синього кольору.

Цю реакцію можна зупинити шляхом додавання стоп-розчину, після чого вміст лунки з синього кольору перетворюється на жовтий. Абсорбція жовтої реакційної суміші вимірюється на спектрометрі для мікропланшетів при довжині хвилі 450 нм. Нижча абсорбція свідчить про наявність TRAb у тест-зразку, оскільки, TRAb інгібують зв'язування біотину TSH до TSHR, нанесеними на лунки мікропланшета.

Діапазон вимірювання становить від 1 - 40 Од/л (NIBSC 08/204).

4. ЗБЕРІГАННЯ ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ СИРОВАТКИ

Зразки сироватки необхідно протестувати одразу після відокремлення або зберігати при температурі не більше -20°C, бажано в аліквотах.

150 мкл достатньо для одного аналізу (дублювання 75 мкл визначень).

Унікати повторного замороження /розмороження сироватки.

Неправильне зберігання зразків сироватки може привести до втрати активності TRAb.

Не використовувати ліпемічні або гемолізовані зразки сироватки.

Не використовувати плазму в аналізі.

Якщо потрібно, доведіть сироватку до кімнатної температури (20°C - 25°C) та обережно перемішайте до однорідної консистенції. Центрифугуйте сироватку до початку аналізу (приблизно 5 хвилин при 10-15,000 об/хв у мікроцентрифузі) для видалення будь-яких твердих частинок. Не пропустіть, будь ласка, це етап центрифугування сироватки, яка є мутною або містить тверді частинки.

5. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

- дозатори на 50 мкл, 75 мкл та 100 мкл
- мірний посуд для відновлення або розведення реагентів
- очищена вода

Перекладач Романюк Н.П.

- спектрофотометр для ІФА-планшетів з вимірювальною здатністю при 450 нм.
- Шейкер для ІФА-планшетів, на 500 струшувань/хвилину. (не орбітальний)
- Кришка для ІФА-планшетів

6. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Зберігайте невідкриті набори та всі компоненти набору (А-К) при температурі від 2 °С до 8 °С.

1.	A	Мікролунки з нанесеними рецептором TSH 12 роздільних стрипів по 8 лунок (всього 96) у рамці та запаковані у пакет із фольги. Залишити при кімнатній температурі (20°C - 25°C) принаймні на 30 хвилин перед відкриттям. Міцно закріпіть лунки у рамці. Після відкриття покладіть всі не використані лунки назад у пакет із фольги та герметично закрийте. Помістіть пакет з фольги у пакет із замком разом з осушувачем. Зберігати при температурі 2°C-8°C до закінчення терміну придатності набору.
2.	B	Стартовий буфер , 10 мл Готовий до використання
3.	C1-4	Калібратори 1, 2, 8 та 40 Од/л (одиниці відповідають стандарту NIBSC 08/204) 4 x 1,0 мл, готові до використання.
4.	D1	Негативний контроль , 1.0 мл Готовий до використання.
5.	D2	Позитивний контроль (Див. на етикетці флакону діапазон) 1.0 мл Готовий до використання.
6.	E	Біотин- TSH , 3 флакони Ліофілізований Відновіть кожен флакон з 4,5 мл буферу для відновлення для біотинільованого ТТГ (F). Якщо потрібно більше ніж один флакон, змішайте вміст усіх флаконів та обережно перемішайте перед використанням. Зберігати при температурі 2°C - 8°C до закінчення терміну придатності флакону.
7.	F	Буфер для відновлення біотин-TSH , 15 мл Готовий до використання
8.	G	Стрептавідин, кон'югований з пероксидазою (SA-POD) , 0,75 мл Концентрований. Розведіть 1:20 з розчинником для SA-POD (H). Наприклад, 0,5 мл (G) + 9,5 мл (H). Зберігати при температурі 2°C - 8°C до закінчення терміну придатності набору.
9.	H	Розчинник для стрептавідин-пероксидази , 15 мл Готовий до використання.
10.	I	Субстрат пероксидази (ТМБ) , 15 мл Готовий до використання.
11.	J	Концентрований промивний розчин , 100 мл Концентрований. Розведіть в 1 літрі чистої води перед використанням. Зберігати при температурі 2°C - 8°C до закінчення терміну придатності.
12.	K	Стоп-розчин , 10 мл Готовий до використання

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Залишити всі реагенти та зразки при кімнатній температурі (20°C - 25°C) принаймні на 30 хвилин перед використанням. Для етапів 1, 5, 8, 10 і 11 рекомендується використати повторювальну піпетку типу Eppendorf. Рекомендовано, проводити визначення у дублікатах для сироватки, калібраторів та контролів.

1. Піпетувати **75 мкл** стартового буферу (B) у кожну лунку, залишивши одну лунку порожньою для бланку (див. етап 12).
2. Піпетувати **75 мкл** сироватки, калібраторів (C1-4) та контролів (D1 та D2) у відповідні лунки (розпочати з 40 Од/л калібратора, потім опустити вниз планшет до негативного контролю та протестувати сироватку), залишивши останню лунку для бланку.
3. Накрити рамку та потрусити лунки протягом 2 годин при кімнатній температурі на планшетному ІФА-шейкері (500 струшувань/хв.).
4. Після інкубації, видалити зразки за допомогою миючого пристрою, або витрясти зразки, перевернувши планшет. Промити лунки 1 раз розведеним промивним розчином (J) видалить вміст лунок за допомогою миючого пристрою або витрусити на абсорбуючий матеріал. Обережно постукайте перевернутими лунками по чистій та сухій абсорбуючій поверхні для видалення залишків рідини (тільки у випадку ручного промивання).

- Внесіть **100 мкл** відновленого біотину-TSH (E) у кожну лунку (крім бланку). Уникати розбризкування матеріалу під час внесення у лунку.
- Накрийте планшет та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 25 хвилин без струшування.
- Повторіть етап промивання 4.
- Піпетуйте **100 мкл** розведеного стрептавідину кон'югованого з пероксидазою (G) у кожну лунку (окрім бланк-лунки), накрийте планшет та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 20 хвилин без струшування.
- Після інкубації, видалити зразки за допомогою миючого пристрою для планшетів або різко витрусивши вміст лунок у відповідну ємкість. Двічі промийте лунки розведеним розчином для промивання (J). Потім один раз промити чистою водою (для видалення піни) та обережно постукати по перевернутим лункам по чистій та сухій вологопоглинаючій поверхні, щоб видалити залишок промивного розчину (якщо використовуєте пристрій для промивання планшетів, то потрібно промивати 3 рази з промивним розчином (J) тільки).
- Піпетуйте **100 мкл** ТМБ (I) у кожну лунку (включаючи бланк) та інкубуйте у темряві при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, не струшуючи.
- Піпетувати **50 мкл** стоп-розчину (K) у кожну лунку (включаючи бланк), накрийте планшет та потрусіть приблизно 5 секунд на шейкері для планшетів. Час інкубації повинен бути однаковим для кожної лунки.
- Протягом 15 хвилин, зчитати абсорбцію для кожної лунки при 450 нм на спектрофотометрі для ELISA-планшетів. Налаштувати спектрофотометр по бланк-лунці, яка містить тільки **100 мкл** ТМБ (I) та **50 мкл** стоп-розчину (K).

8. РЕЗУЛЬТАТ АНАЛІЗУ

Побудувати калібрувальну криву, відклавши концентрації калібраторів на осі X (log-шкала) проти абсорбції калібраторів на осі Y (лінійна шкала). Концентрації TRAb у сироватці пацієнтів можна зчитати з калібрувальної кривої (коефіцієнт згладжування = 0).

Негативному контролю можна присвоїти значення 0.1 для сприяння комп'ютерній обробці результатів аналізу.

Можуть використовуватися й інші системи скорочення даних.

Результат, також можна показати у вигляді інгібування зв'язування ТТГ (в %), розрахованого за наступною формулою:

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{абсорбція зразка при 450 нм}}{\text{абсорбція негативного контролю (D1) при 450 нм}} \right]$$

Зразки з високими концентраціями TRAb можна розводити негативним контролем (D1). Наприклад, 20 мкл зразка плюс 180 мкл негативного контролю дадуть 10-кратне розведення. Інші розведення (напр., 100x) можна приготувати з 10-кратного розведення або іншим способом. Деякі сироватки не розводяться лінійним способом, і ми пропонуємо, щоб розведення, які дають значення 50% зниження, використовувалися для підрахунку концентрації TRAb.

ТИПОВІ РЕЗУЛЬТАТИ

(Тільки в якості прикладу, не використовувати для обчислення фактичних результатів)

Зразок	A450 (мінус бланк)	%I	О/л
Негативний контроль	2.00	0	0
C1	1.70	15	1
C2	1.50	25	2
C3	0.65	68	8
C4	0.15	93	40
Позитивний контроль	1.26	37	3,5

9. ЗНАЧЕННЯ CUT-OFF АНАЛІЗУ

	О/л
Негативний	≤ 1 О/л
Сумнівний	< 1.0 – 1.5 О/л
Позитивний	> 1.5 О/л

Це значення cut-off було підтверджено у DRG. Однак, кожна лабораторія повинна встановлювати свої власні нормальні та патологічні референсні діапазони для рівнів TRAb. Також рекомендується, щоб кожна лабораторія включала свою власну панель контрольних зразків у аналіз.

10. КЛІНІЧНА ОЦІНКА

10.1 Клінічна специфічність

154 зразки від здорових донорів були проаналізовані за допомогою набору TRAb ІФА.

152 зразки (99%) дали негативний результат на наявність TRAb.

10.2 Клінічна чутливість

50 зразків сироватки з діагнозом хвороби Грейвса було досліджено з використанням набору TRAb ELISA.

49 (98%) дали позитивний результат на наявність TRAb.

1 зразок (2%) показав сумнівний результат.

10.3 Функціональна чутливість

Діаграма KB між тестами до О/л показала коефіцієнт варіації 20% при концентрації 0.60 О/л.

10.4 Нижня межа виявлення

Негативний контроль набору був досліджений 32 рази з розрахунком середнього та стандартного відхилення. Нижня межа виявлення при +2 стандартному відхиленні становила 0.21 О/л.

10.5 Точність в аналізі

Зразок	О/л (n=20)	KB (%)
1	3.9	12.9
2	5.4	10.9

10.6 Точність між аналізами

Зразок	О/л (n=25)	KB(%)
1	1.8	7.1
2	7.8	2.2

10.7 Клінічна правильність

Аналіз сироваток пацієнтів з автоімунними захворюваннями, крім хвороби Грейвса, не виявив впливу на результат антитіл до тиреоглобуліну, ТПО, декарбоксілази глютамінової кислоти; 21-гідроксилази; ацетилхолінових рецепторів; двоспіральної ДНК або ревматоїдного фактору.

10.8 Інтерференція

Ніяких перешкод не спостерігалось, коли зразки були насичені наступними матеріалами;

Гемоглобін до 5 мг/мл;	Білірубін до 0.2 мг/мл;
Інтраліпід до 30 мг/мл;	
ЛГ людини до 10 О/мл;	ХГЛ до 160 О/мл;
ФСГ людини до 70 О/мл	ТТГ до 30 О/л

11. ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

Стрептавідин кон'югований пероксидазою (SA-POD)

Сигнальне слово: Обережно

Положення про небезпеку

H317: Може викликати алергічну реакцію

Заходи безпеки

P280: Одягати захисні рукавиці/захисний одяг/захист для очей/захист для обличчя

P302 + 352: ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: промити великою кількістю води з милом

P333 + P313: При подразненні та почервонінні: зверніть до лікаря

P362 + P364: Зняти забруднений одяг та попати до наступного використання.

Стартовий буфер та концентрований промивний розчин

Сигнальне слово: Обережно

Попередження про небезпеку

H319: Викликає серйозне подразнення очей

Заходи безпеки

P280: Одягати захисні рукавиці/захисний одяг/захист для очей/ захист для обличчя

P305 + P351 + P338: ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: ретельно промивати водою протягом кількох хвилин. Зняти контактні лінзи, якщо вони є і якщо це легко зробити. Продовжити промивання.

P337 + P313: Якщо подразнення очей не зникає: Зверніться до лікаря.

- цей набір призначений тільки для професійних in vitro досліджень.
- Чітко дотримуйтеся інструкції.
- Дотримуватися термінів придатності, вказаних на етикетці та термінів стабільності для покритих лунок, розведених або відновлених реагентів.
- Більш детальна інформація щодо безпеки вказана у паспорті безпеки хімічної продукції.
- Матеріали людського походження, які використані у даному наборі, були попередньо протестовані та показали негативний результат на ВІЛ ½ та гепатити, проте, з ними завжди слід поводитися як потенційно інфекційним матеріалом.
- У випадку забруднення рук реагентами, ретельно промийте руки перед виходом з лабораторії.
- Перед утилізацією, всі потенційно інфекційні відходи потрібно стерилізувати.

- Матеріали тваринного походження, який використано у підготовці набору, був отриманий від здорових тварин, проте з ними слід поводитися як з потенційно інфекційними.
- Всі компоненти набору не ковтати, уникати вдихання, попадання у кровообіг, а також попадання на шкіру, в очі та одяг.
- Уникати утворення азидів важких металів у дренажній системі промиваючи будь-який компонент з набору великою кількістю води.



ВИРОБНИК

DRG Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/170 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de

12. ПЛАН АНАЛІЗУ

Перед використанням доведіть усі реагенти та зразки до кімнатної температури (20°C - 25°C)	
Піпетувати:	75 мкл Стартового буферу у кожен лунку (за винятком бланку)
Піпетувати:	75 мкл калібраторів (починаючи з найвищої концентрації та знижуючись до найнижчої), контролю, сироватка пацієнта (за винятком бланку)
Інкубувати	2 години при кімнатній температурі на шейкері планшетів ELISA при 500 струшувань/хв
Аспірувати/Декант.:	Планшет
Мити:	Планшет один раз автоматичним вошером (або промити один раз, інвертувати та перевернути, висушити на абсорбуючому матеріалі для ручного миття)
Піпетувати:	100 мкл Біотин-ТТГ (відновлений) у кожен лунку
Інкубувати:	25 хвилин при кімнатній температурі не струшуючи
Аспірувати/Декант.:	Планшет
Мити:	Планшет один раз як описано вище
Піпетувати:	100 мкл SA-POD (розведеного 1:20) у кожен лунку (за винятком бланку)
Аспірувати/Декант.:	Планшет
Мити:	Планшет три рази на автоматичному вошері (або двічі, промити один раз чистою водою та висушити на абсорбуючому матеріалі для ручного миття)
Піпетувати:	100 мкл ТМБ у кожен лунку (включаючи бланк)
Інкубувати:	30 хвилин при кімнатній температурі у темряві не струшуючи
Піпетувати:	50 мкл стоп-розчину у кожен лунку (включаючи бланк) та потрусити протягом 5 секунд
Зчитати абсорбцію при 450 нм, протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину	
Не проводити аналіз при температурах вище 25°C.	



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua



ВИРОБНИК

DRG Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/170 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de