

ZenTech



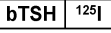
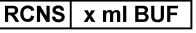
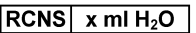
RIAZEN TSH-R Ab

DEUTSCH	(de)
ENGLISH	(en)
ESPAÑOL	(es)
ΕΛΛΗΝΙΚΑ	(el)
FRANÇAIS	(fr)
ITALIANO	(it)
NEDERLANDS	(nl)
POLSKI	(pl)
PORTUGUES	(pt)

ZenTech s.a.
Liège Science Park
Avenue du Pré-Aily 10,
4031 ANGLEUR, Belgium
Tel. : + 32-(0)4-361.42.32
Fax : + 32-(0)4-367.00.63

info@zentech.be
www.zentech.be

ISO15223	SYMBOLS FÜR MEDIZINPRODUKTE	MEDICAL DEVICES SYMBOL	SÍMBOLOS PARA APARATOS DE USO EN MEDICINA	ΣΥΜΒΟΛΟ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΣΥΣΚΕΥΩΝ ΚΑΤΑ	SYMBOLS APPLIQUES AUX DISPOSITIFS MEDICAUX	SIMBOLI DISPOSITIVI MEDICI	SYMBOL CONFORM MEDISCHE HULPMIDDELEN	SYMBOL URZĄDZENIA MEDYCZNEGO	SÍMBOLOS DE DISPOSITIVO MÉDICO
	LIMITIERUNG DER LAGERTEMPERATUR	STORAGE TEMPERATURE LIMITATION	LIMITES DE TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΦΥΛΑΞΗΣ	LIMITES DE TEMPERATURES	Conservare a	TEMPERATUURLIMIET	OGRANICZENIA TEMPERATURY PRZECHOWYWANIA	LIMITE DA TEMPERATURA DE ARMAZENAGEM
	CHARGENCODE	BATCH CODE	CÓDIGO DE LOTE	ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ	NUMERO DE LOT	Lotto	LOT NUMBER	KOD SERII	LOTE
	VERWENDBAR BIS	USE BY	CONSUMIR ANTES DE	ΗΜΕΡΟΜ. ΛΗΞΗΣ	DATE D'EXPIRATION	Data di scadenza	HOUDBAAR TOT	ZUŻYĆ PRZED	UTILIZADO POR
	DAS HANDBUCH ZU RATE ZIEHEN	CONSULT OPERATING INSTRUCTIONS	CONSULTAR LAS INSTRUCCIONES DE MANEJO O FUNCIONAMIENTO	ΑΝΑΤΡΕΞΤΕ ΣΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	LIRE LES INSTRUCTIONS	Consulti l'istruzione per l'uso	RAADPLEEG DE GEBRUIKSAANWIJZING	ZAPOZNAĆ SIĘ Z INSTRUKCJĄ	CONSULTE O MANUAL DE OPERAÇÕES
	FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTISCHE ANWENDUNG	IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE	DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΥΣΚΕΥΗ IN VITRO	IN VITRO DIAGNOSTIC	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	IN VITRO DIAGNOSTISCH PRODUCT	URZĄDZENIE DO DIAGNOSTYKI IN VITRO	DISPOSITIVO DE DIAGNOSTICO IN VITRO
	HERGESTELLT VON	MANUFACTURED BY	FABRICADO POR	ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ	FABRIQUE PAR	Prodotto da	FABRIKANT	PRODUCENT	FABRICADO POR
	KATALOG NR.	CATALOGUE NUMBER	NÚMERO DE CATÁLOGO	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ	REFERENCE	Numero di catalogo	CATALOGUS NUMMER	NUMER KATALOGOWY	NÚMERO DO CATALOGO

	SYMBOLS (EMPFOHLEN VON DER EDMA)	SYMBOLS (EDMA RECOMMENDATIONS)	SÍMBOLOS (RECOMENDACIONES DE LA EDMA)	ΣΥΜΒΟΛΑ (Συστάσεις EDMA)	SYMBOLS (recommandations EDMA)	SIMBOLI (raccomandazioni EDMA)	SYMBOLS (EDMA-AANBEVELINGEN)	SYMBOLS (ZALECANE PRZEZ EDMA)	SÍMBOLOS (RECOMENDAÇÕES EDMA)
	Anzahl der Bestimmungen	number of determinations	Número de determinaciones	Αριθμός προσδιορισμών	Nombre de déterminations (Σ)	NUMERO DI DETERMINAZIONI	Inhoud voldoende voor "n" tests	liczba oznaczeń	Número de determinações
	Rezeptor	Receptor	Receptor	Υποδοχέας	Récepteur	Recettore	Receptor	Receptor	Receptor
	Radioaktiver Tracer	Radioactive tracer	Trazador radiactivo	Ραδιενεργός ιχνηθέτης	Traceur radioactif	TRACCIANTE RADIOATTIVO	Radioactieve tracer	znacznik radioaktywny	Marcador radioativo
	Kalibrator	Calibrator	Calibrador	Βαθμονομητής	Calibrateurs	CALIBRATORE	Kalibrator	Kalibrator	Calibrador
	Kontrolle	Control	Control	Ορός ελέγχου	Contrôle	CONTROLLO	Controle	Kontrola	Controle
	NSB-Lösung	NSB solution	Solución de NSB	Διάλυμα NSB	Solution NSB	Recettore di controllo	NSB-oplossing	roztwór NSB	Solução de NSB
	Wiederherstellen mit x ml Puffer	Reconstitute with x ml buffer	Reconstituir con tampón de x ml	Ανασύσταση με x ml ρυθμιστικού διαλύματος	Reconstituer avec x ml de tampon	Ricostituire con x ml di tampone	Reconstitueer met x ml buffer	Rozpuścić w x ml buforu	Reconstitua com x ml Tampão
	Wiederherstellen mit x ml Aqua dest	Reconstitute with x ml distilled water	Reconstituir con x ml de agua destilada	Ανασύσταση με x ml απεσταγμένου νερού	Reconstituer avec x ml d'eau distillée	Ricostituire con x ml di acqua distillata	Reconstitueer met x ml gedestilleerd water	Rozpuścić w x ml wody destylowanej	Reconstitua com x ml água destilada
	Fällungslösung	Precipitating solution	Solución precipitante	Καθιζάνον διάλυμα	Solution de précipitation	PEG soluzione	Precipiterende oplossing	Roztwór strącający	Solução de Precipitação
	Puffer	Buffer	Tampón	Ρυθμιστικό διάλυμα	Tampon	Tampone	Buffer	Bufor	Tampão

DEUTSCH

RADIOREZEPTORASSAY ZU QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON ANTI-TSH-REZEPTOREN-AUTOANTIKÖRPERN IN HUMANEM SERUM R-CT-50 – 50 Bestimmungen / R-CT-100 – 100 Bestimmungen

DIESER KIT IST NUR FÜR DIE IN - VITRO - DIAGNOSTIK BESTIMMT

1. KLINISCHE ANWENDUNGEN

Hyperthyreose bei der Graves-Erkrankung ist zurückzuführen auf Autoantikörper, die gegen die Thyreotropin-(TSH) Rezeptoren gerichtet sind. Die Messung dieser Autoantikörper ist wertvoll für die Diagnose und Behandlung der Graves-Erkrankung.

2. TESTPRINZIP

Der TSH-Rezeptor-Autoantikörpertest ist ein Radiorezeptorassay (RRA), welcher Autoantikörper bestimmt, die sich zwischen die Bindungen des Thyreoidea stimulierenden Hormons (TSH) und die TSH-Rezeptoren drängen.

In dem Assay werden TSH-Rezeptoren mit Serum inkubieren und nach der Vorinkubation wird ¹²⁵I markiertes TSH (Tracer) hinzugegeben. Die Autoantikörper und der Tracer konkurrieren um die Bindungsstellen der Rezeptoren. Daraus folgt, je höher der Autoantikörpertiter, desto weniger mit ¹²⁵I-TSH (Tracer) kann sich an die Rezeptoren binden. Nach der Inkubation wird der Rezeptor-Tracer-Komplex mit Polyethylenglykol (PEG) gefällt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand entfernt und die Radioaktivität im Pelle gemessen. Die Konzentration der TSH-Rezeptor-Autoantikörperaktivität in der Probe wird bestimmt durch eine Eichkurve und in Units/l (U/l) angegeben.

3. MITGELIEFERTES MATERIAL

- Die Reagenzien sind ausreichend für 100 Bestimmungen.
- Lagern Sie den Kit und die Reagenzien bei 2 – 8° C .
- Das Verfallsdatum jedes Reagenz ist auf dem Etikett angegeben.

1. **Radioaktiver Tracer:** 2 (4) Fläschchen enthalten 3.0 ml gereinigtes mit ¹²⁵I markiertes b-TSH, lyophilisiert . Zur Wiederherstellung der Gebrauchslösung geben Sie in jedes Fläschchen 3.0 ml Aqua dest und mischen es vorsichtig. Stellen Sie den Tracer erst 10 Minuten vor Beginn des Assays her. Überschüssige Lösungen müssen verworfen werden. Die Radioaktivität pro Fläschchen beträgt 12,8kBq. Konservierungsmittel: NaN₃<0,1%

2. **Kalibratoren:**

Nullkalibrator: 1 Fläschchen enthält 1 ml humanes Serum. Konservierungsmittel: NaN₃<0,1%

Kalibratoren 1-5: 5 Fläschchen enthalten 0,5 ml b-TSH in humanem Serum mit den folgenden Konzentrationen: 5, 15, 45, 135, 405 U/l. Konservierungsmittel: NaN₃<0,1%. Die Kalibratoren in diesem Assay sind gegen den MRC LATS Standard B standardisiert worden, sodass 1 Einheit vom Kalibrator ungefähr äquivalent mit 1 Einheit des MRC LATS Standard B ist.

3. **Kontrollen:** 2 Fläschchen enthalten 0,5 ml Serum. Konservierungsmittel: NaN₃<0,1%.

Die Sollwerte entnehmen Sie bitte dem Qualitätskontroll-Datenblatt.

4. **TSH-Rezeptor:** 2 (4) Fläschchen enthalten TSH-Rezeptoren, lyophilisiert. Konservierungsmittel : NaN₃<0,1%. Zur Wiederherstellung der Gebrauchslösung geben Sie 1,5 ml des kalten Puffers hinzu und mischen vorsichtig. Warten Sie 10 Minuten, bis sich der Inhalt zu einer gleichmäßigen Suspension aufgelöst hat. Mischen Sie dann den Inhalt auf einem Vortexmischer bei maximaler Einstellung, um ein Auflösen des Rezeptors sicherzustellen. Die Gebrauchslösung des TSH-Rezeptors ist nicht sehr stabil. Jede überschüssige Lösung, die in dem Test nicht gebraucht wurde, muss verworfen werden.

5. **NSB(Kontrollrezeptor):** 1 Fläschchen enthält 1 ml NSB-Lösung. Konservierungsmittel: NaN₃<0,1%.

6. **Puffer:** 1 Fläschchen enthält 6,5 ml gepufferter Lösung zur Wiederherstellung des TSH-Rezeptors. Konservierungsmittel: NaN₃<0,1%. Benutzen Sie immer kalten Puffer zur Wiederherstellung des TSH-Rezeptors.

7. **PEG:** 1 (2) Fläschchen mit gepufferter Lösung enthält 100 ml PEG. Konservierungsmittel: NaN₃<0,1%.

4. ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTES, MATERIAL

- Konische Teströhrchen (12×75 mm)
- Racks für die Teströhrchen
- einstellbare, automatische Mikropipetten mit Einmalspitzen
- Vortexmischer
- Graduierter Zylinder
- Absaugpumpe oder automatische Waschanlage
- Szintillations-Gamma-Counter
- destilliertes Wasser
- Orbitalschüttler
- Kühlzentrifuge (min 2500 x g)

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen folgende Regeln eingehalten werden:

- Verwenden oder mischen Sie keine Testkomponenten unterschiedlicher Chargen.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Verwenden Sie nur völlig saubere Glasutensilien.
- Benutzen Sie destilliertes Wasser, dass in geeigneten, sauberen Behältern aufbewahrt werden muss.
- Vermeiden Sie jede Kontamination der einzelnen Reagenzien; so müssen für jede Probe und jedes Reagenz Einmalpipettenspitzen verwendet werden.

Um die Kontamination von Personen und Umgebung zu vermeiden, müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden.

- Tragen Sie während der Durchführung des Assays sowie beim Umgang mit potentiell infektiösem Material Einweghandschuhe.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Rauchen, Essen und Trinken Sie nicht bei der Durchführung des Assays; benutzen Sie währenddessen keine Kosmetika.
- Alle Materialien humaner Herkunft zur Herstellung dieses Kits sind negativ auf HBs-Ag, Anti-HIV und Anti-HCV getestet. Da jedoch keine der zur Zeit verfügbaren Testmethoden absolute Gewähr für das Fehlen dieser Viren garantieren kann, müssen alle Proben und Reagenzien als potentiell infektiös betrachtet werden ; deshalb muss der Assayabfall dekontaminiert und beseitigt werden in Übereinstimmung mit den etablierten Sicherheitsstandards.
- Vorhandene entzündbare Materialien müssen verbrannt werden; nicht entzündbare Materialien müssen im Autoklaven mindestens 1 Stunde bei 121 °C sterilisiert werden.
- Flüssigem Abfall muss Natriumhypochlorit zugefügt werden, um eine Endkonzentration von 3% zu erhalten. Diese muss mindestens 30 Min. einwirken. Flüssiger säurehaltiger Abfall muss zunächst mit einer geeigneten Menge an Base neutralisiert werden, bevor er mit Natriumhypochlorit versetzt werden kann.
- Vermeiden Sie Spritzen und Aerosolbildung. Für den Fall einer Kontamination durch Spritzer reinigen Sie sorgfältig mit 3% iger Natriumhypochloritlösung und entsorgen diese Reinigungsflüssigkeit als potentiell infektiösen Abfall.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel; um den Aufbau von explosiven Metallaziden in Rohr- und Kupferleitungen zu verhindern, müssen die Reagenzien unter großen Mengen fließenden Wassers entsorgt werden.
- Beschaffung, Lagerung, Nutzung und Beseitigung radioaktiver Materialien (flüssig und fest) sind Gegenstand von Gesetzen und Vorschriften der zuständigen, lokalen Behörden.

6. SAMMLUNG VON EINZELPROBEN

Die zu analysierenden Proben müssen nach der Separation bald getestet oder in Teilmengen bei -20°C aufbewahrt werden. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Eine falsche Aufbewahrung der Proben kann zu einem Verlust der TSH-Rezeptor Autoantikörperaktivität führen.

Benutzen Sie keine stark hämolytischen- oder lipämischen Proben.
Benutzen Sie kein Plasma in diesem Assay.
Wenn die Proben eingefroren waren, müssen Sie auf Raumtemperatur gebracht, durch Umschwenken vorsichtig gemischt werden, um eine Homogenität sicherzustellen.
Zentrifugieren Sie die Proben vor der Analyse (vorzugsweise bei 1,000-1,500 g in einer Mikrofuge), um ausfallende Substanzen zu entfernen.

7. TESTVERLAUF MIT ODER OHNE KALIBRATOREN

- Der Gebrauch von konischen Röhrchen aus Polystyren ist dringend empfohlen.
Beschriften Sie je zwei Röhrchen für Total Counts(T), Nicht spezifische Bindungen(NSB), Nullkalibrator(Bo), Kalibratoren, Kontrollen und Proben.
- NSB:** Pipettieren Sie 50µl der NSB-Lösung in die dafür vorgesehenen Röhrchen + 50µl des Nullkalibrators.
- Nullkalibrator:** Pipettieren Sie 50µl des Nullkalibrators in die dafür vorgesehenen Röhrchen.
- Kalibratoren:** Pipettieren Sie 50µl von jedem Kalibrator in die jeweiligen Röhrchen.
Diesen Schritt 4 brauchen Sie bei einem Testverlauf ohne Kalibratoren nicht durchzuführen.
- Proben und Kontrollen:** Pipettieren Sie 50µl der Kontrollen oder des Patientenserums in die jeweiligen Röhrchen.
- Geben Sie 50µl der TSH-Rezeptor-Lösung in alle Röhrchen, außer in die für die Total Counts und NSB.
Mischen Sie alle Röhrchen mit dem Vortexmixer.
- Inkubieren Sie 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm.
- Geben Sie 100µl des mit ¹²⁵J markierten b-TSH (Tracer) in alle Röhrchen und mischen Sie sie auf dem Vortexmixer.
- Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm.
- Rühren Sie die PEG-Lösung mit Hilfe eines Magnetrührers und geben Sie 2ml der kalten PEG-Lösung in alle Röhrchen, außer in die Röhrchen für die Total Counts.
Wichtig: Mischen Sie alle Röhrchen gründlich mit Hilfe eines Vortexmixers
- Zentrifugieren Sie alle Röhrchen, außer die für die Total Counts, in einer Kühlzentrifuge bei ca. 2,500xg für 30 Minuten.
- Saugen Sie den Überstand vorsichtig ab.
- Zählen Sie die Radioaktivität aller Röhrchen für 1 Minute.

VERSUCHSSCHEMA

Röhrchen Reagenzien	Total- aktivität	NSB	Null- kalibrator	Kalibratoren	Kontrollen	Proben
NSB	-	50 µl	-	-	-	-
Nullkalibrator	-	50 µl	50 µl	-	-	-
Kalibratoren*	-	-	-	50 µl	-	-
Kontrollen	-	-	-	-	50 µl	-
Proben	-	-	-	-	-	50 µl
TSH Rezeptor	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
- vorsichtig mischen und 10 min. inkubieren bei R.T., schüttelnd bei 150 rpm						
Tracer	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
- Inkubation: 2 STd. bei R.T., schüttelnd bei 150 rpm						
PEG	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
- zentrifugieren 30 min. (4°C) bei 2,500g						
- absaugen des Überstandes.						
- zählen der Radioaktivität der Röhrchen 1 min. im Gamma-Zähler						

*nur bei der Methode mit Kalibratoren

8. KALKULATION DER RESULTATE

- Assay-Validation

- Bestimmen Sie den Mittelwert der Zählraten (cpm) für alle Doppelbestimmungen
- Errechnen Sie den Prozentsatz der Nicht spezifischen Bindungen (NSB) wie folgt:

$$\text{NSB} / \text{T} \% = \text{Zählrate der NSB} / \text{Zählrate der Totalaktivität} \times 100$$

- Errechnen Sie die maximale Bindungsrate, die im Test benutzt wurde, wie folgt:

$$\frac{\text{Bo} - \text{NSB}}{\text{T}} \% = \frac{\text{Zählrate des Nullkalibrators} - \text{Zählrate des NSB}}{\text{Zählrate der Totalaktivität}} \times 100$$

-mit Kalibratoren

Als erstes errechnen Sie für jede Doppelbestimmung den Mittelwert und korrigieren ihn um den NSB-Wert.

$$\text{Nettozählrate d. Röhrchen} = \text{Mittelwert d. Zählrate d. Röhrchen} - \text{Mittelwert d. Zählrat d. NSB}$$

Ermitteln Sie die Bindungen aller Doppelbestimmungen als gebundenen Prozentsatz des markierten TSH an die TSH-Rezeptoren in Gegenwart eines negativen Kontrollserums.

$$\text{gebundener Protentsatz} = \frac{\text{Netto Zählrate}}{\text{Netto Bo-Zählrate}} \times 100$$

Benutzen Sie logarithmisches Papier und tragen den gebundenen Prozentsatz auf die y-Achse auf gegen die Konzentrationen der Kalibratoren auf der x-Achse. Zeichnen Sie eine Gerade durch die Kalibratorenpunkte. Die unbekannten Konzentrationen sind durch Interpolation an der Geraden zu ermitteln.

Im Falle einer Computer unterstützten Analyse muss ein speziell passendes Programm für Radioimmunoassays benutzt werden und geeignet adaptiert an den Zählcomputer sein.

KALKULATIONSBEISPIEL MIT KALIBRATOREN

Die unten aufgeführten Werte müssen als Beispiel gesehen werden und sollten nicht an Stelle experimentell gewonnener Daten verwendet werden.

Beschreibung	Mittelwert cpm.	B/B0 (%)	TRAB conc. (U/l)
Totalaktivität (T)	20230	-	-
NSB	832	-	-
CAL 0	8941	100	0
CAL 1	8229	91,2	5
CAL 2	6011	63,9	15
CAL 3	3999	39,1	45
CAL 4	2441	19,8	135
CAL 5	1725	11,0	405
CONTROL 1	6005	63,8	15,9
CONTROL 2	4231	41,9	44,3
P1	7836	86,4	5,7
P2	3679	35,1	53,7
P3	2675	22,7	109,5

-ohne Kalibratoren

Die Referenzpunkte des Assays sind festgelegt durch den Gebrauch des mitgelieferten Nullkalibrators. Als erstes subtrahieren Sie den Kontrollrezeptor (NSB) jedes Röhrchens, welches spezifische TSH-Bindungen enthält.

$$\text{Spezifische Bindung} = \text{Zählrate d. Röhrchen} - \text{NSB}$$

Dann errechnen Sie die inhibierten TSH-Bindungen wie folgt:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{Spezifische Bindungen in Gegenwart der Testproben}}{\text{Spezifische Bindungen in Gegenwart des Nullkalibrators}} \times 100$$

KALKULATIONSBEISPIEL OHNE KALIBRATOREN

Die unten aufgeführten Werte müssen als Beispiel gesehen werden und sollten nicht an Stelle experimentell gewonnener Daten verwendet werden.

Beschreibung	Mittelwert cpm.	Inhibition (%)
Totalaktivität (T)	20230	-
NSB	832	-
CAL 0	8941	-
Kontrolle 1	6005	36,2
Kontrolle 2	4231	58,1
P1	7836	13,6
P2	3879	64,9
P3	2675	77,3

9. REFERENZWERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzintervalle bestimmt. Die unten aufgeführten Werte sind lediglich indikativ.

- mit Kalibratoren

Niedriger als 9 U/l:	Negativ für TSH-R Auto-Antikörper
Zwischen 9–14 U/l	Grenzwert
Höher als 14 U/l:	Positiv für TSH-R Auto-Antikörper

- ohne Kalibratoren

Um die Inhibitionswerte für die positiven Resultate zu ermitteln, sehen Sie bitte in dem Qualitätskontroll-Datenblatt nach.

10. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

SPEZIFITÄT

Die Addition der folgenden Level möglicher beeinträchtigender Substanzen verursachen keinen signifikanten Unterschied in den quantitativen TSH-Rezeptor Autoantikörperleveln.

Substanzen	Konzentrationen
FSH	≤23000mIU/ml
LH	≤1200mIU/ml
HCG	≤140ng/ml
Thyreoglobulin	≤10µg/ml
Prolactin	≤135ng/ml
TSH	≤890mIU/l
HGH	≤1000ng/ml
IgM*	≤4.39mg/ml
IgA*	≤4.23mg/ml
IgG*	≤36mg/ml

*Gesamtkonzentration (Serumkonzentration+ zugefügte Immunglobulin)

SENSITIVITÄT

Analytische Sensitivität

Die Sensitivität wird basierend auf der Eichkurve kalkuliert und ist definiert als die kleinste Konzentration, die einen signifikanten Unterschied zum Nullkalibrator ergibt (Mittelwert - 2fache Standardabweichung).

Diese Konzentration ist 0,8 U/l.

Funktionale Sensitivität

Die funktionale Testsensitivität ist der niedrigste Wert, der mit einer Präzision von maximal 20% Inter-Assay Varianz gemessen wird. Bei den TSH-R Antikörpern beträgt dieser Wert 5,0 U/L.

PRÄZISION

Die Präzision wurde evaluiert nach Intra-Assay und Inter-Assay Variabilität, bei verschiedenen Konzentrationen der Analyten.

Intra-assay

Serum	durchschnittliche (U/l)	±	S.D.	V.K. (%)	N
1	18,4	±	1,4	7,6	20
2	29,8	±	2,3	7,7	20
3	79,3	±	7,7	9,7	20

Inter-assay

Serum	durchschnittliche (U/l)	±	S.D.	V.K. (%)	N
1	17,3	±	1,7	9,8	9
2	52,5	±	2,7	5,1	9
3	93,4	±	8,6	9,2	9

GENAUIGKEIT

Die Genauigkeit der Methode wurde durch Wiederfindungs- und Paralleltests evaluiert.

Wiederfindungs - Test

Proben, vermischt mit den gleichen Volumina jedes Kalibrators, werden getestet.

	gemessene Werte (U/l)	erwartete Werte (U/l)	Wiederfindung (%)
S1	15	-	-
S1 + CAL 0	4	8	59,1
S1 + CAL 1	9	10	90,7
S1 + CAL 2	16	15	105,3
S1 + CAL 3	28	30	93,4
S1 + CAL 4	78	75	103,4
S1 + CAL 5	244	210	116,0
S2	76	-	-
S2 + CAL 0	45	38	117,5
S2 + CAL 1	53	41	129,3
S2 + CAL 2	52	46	114,5
S2 + CAL 3	73	61	119,5
S2 + CAL 4	135	106	127,3
S2 + CAL 5	283	241	117,7

Parallel - Test

Seren mit hohen, analytischen Konzentrationen werden mit unterschiedlichen Verdünnungen mit dem Nullkalibrator getestet.

Verdünnung	gemessene Werte (U/l)	erwartete Werte (U/l)	Wiederfindung (%)
S1 unverdünnt	210	-	-
1/2	123	108	113,9
1/4	63	54	116,7
1/8	27	27	100,0
S2 unverdünnt	139	-	-
1/2	71	69,5	102,2
1/4	37	34,7	106,6
1/8	16	17,4	92,0

Diese Produktinformation ist unter www.zentech.be verfügbar.

ENGLISH

RADIORECEPTOR ASSAY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTI-TSH RECEPTORS AUTOANTIBODIES IN HUMAN SERUM R-CT-50 – 50 Determinations/R-CT-100 – 100 Determinations

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

1. CLINICAL APPLICATION

Hyperthyroidism in Graves' disease is due to auto-antibodies directed against the thyrotropin (TSH) receptor and measurement of these auto-antibodies is valuable in the diagnosis and management of the Graves' disease.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The TSH RECEPTOR AUTO-ANTIBODIES assay is a Radioreceptor Assay (RRA) which detects autoantibodies that interfere with the binding of thyroid stimulating hormone (TSH) to TSH receptor. In the assay, TSH receptor is incubated with serum, and after a pre-incubation time ^{125}I -labelled TSH (tracer). Autoantibodies and tracer compete for binding sites on the receptor. Consequently, the higher the autoantibody titer, the lower the ^{125}I TSH bound to the receptor. Following incubation the receptor-tracer complex is precipitated with polyethylene glycol (PEG). After centrifugation, the supernatant is removed and the precipitate counted. The units of TSH RECEPTOR AUTO-ANTIBODIES activity in the sample are determined from the calibration curve and expressed as units/L (U/L).

3. REAGENTS PROVIDED WITH THE KIT

- The reagents are sufficient for 50 (100) determinations.
- Store the kit and reagents at 2-8°C.
- The expiration date of each reagent is shown on the label.

- 1. Radioactive Tracer :** 2 (4) vials containing 3.0 ml (lyophilised) of purified ^{125}I -bTSH. Reconstitute each vial with 3.0 ml of distilled water and mix gently. Reconstitute the tracer at least 10 min before the beginning of the test. Any excess solution not used in the test must be discarded. Radioactivity content: 12.8 KBq per vial. Preservative: NaN_3 (<0.1%).
- 2. Calibrators: Calibrator 0 :** 1 vial containing 1 ml human serum. Preservative: NaN_3 (<0.1%). **Calibrators 1-5:** 5 vials containing 0.5 ml bTSH in human serum. Preservative: NaN_3 (<0.1%). The calibrators contain 5 – 15 – 45 – 135 – 405 U/L. Calibrators have been standardised in the receptor assay against MRC LATS Standard B. 1 unit of calibration is approximately equivalent to 1 unit of MRC LATS standard B.
- 3. Controls:** 2 vials containing 0.5 ml of serum. Preservative: NaN_3 (<0.1%). **For the exact value, refer to the value written on the Quality Control data sheet.**
- 4. TSH receptor:** 2 (4) vials containing lyophilised TSH receptors. Preservative: NaN_3 (<0.1%). Reconstitute each vial with 1.5 ml of cold buffer, mix gently and allow to dissolve for 10 min until the content is uniformly suspended. Mix the contents on a vortex mixer set at full speed to ensure dissolution of the receptors. Do not reconstitute vials which will not be used immediately in the assay. Reconstituted TSH Receptors are not very stable. Any excess solution not used in the test must be discarded.
- 5. NSB (control receptor):** 1 vial containing 1 ml of NSB solution. Preservative: NaN_3 (<0.1%).
- 6. Buffer:** 1 vial containing 6.5 ml of buffered solution for reconstitution of TSH receptors. Preservative: NaN_3 (<0.1%). Always use a cold solution for reconstitution of TSH receptors.
- 7. PEG:** 1(2) vials of buffered solution containing 100 ml of PEG. Preservative: NaN_3 (<0.1%).

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.

- Conical test tubes (12 x 75 mm).
- Test tube racks.
- Graduated cylinder.
- Distilled water.
- Adjustable, automatic micropipettes with disposable tips.
- Vortex mixer.
- Orbital shaker
- Aspiration pump or automated tube washing device.
- Refrigerated centrifuge (min 2500 x g)
- Scintillation gamma counter.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

In order to obtain reproducible results, the following rules must be observed:

- Do not mix reagents of different lots.
- Do not use reagents beyond their expiry date.
- Use thoroughly clean glassware.
- Use distilled water, stored in clean containers.
- Avoid any contamination among samples; for this purpose, disposable tips should be used for each sample and reagent.

In order to avoid personal and environmental contamination, the following precautions must be observed:

- Use disposable gloves while handling potentially infectious material and performing the assay.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics during the assay.
- All material of human origin used for the preparation of this kit tested negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV. Since no test at present can guarantee complete absence of these viruses, all samples and reagents used for the assay must be considered potentially infectious therefore, the assay waste must be decontaminated and disposed of, in accordance with established safety procedures. Disposable ignitable material must be incinerated; disposable non-ignitable material must be sterilized in autoclave for at least 1 hour at 121°C. Liquid wastes must be added with sodium hypochlorite at a final concentration of 3%. Let the hypochlorite act for at least 30 minutes. Liquid wastes containing acid must be neutralized with appropriate amounts of base, before treating with sodium hypochlorite.
- Avoid splashing and aerosol formation; in case of spilling, wash carefully with a 3% sodium hypochlorite solution and dispose of this cleaning liquid as potentially infectious waste. Some reagents contain sodium azide as preservative; to prevent build-up of explosive metal azides in lead and copper plumbing, reagents should be discarded by flushing the drain with large amounts of water.
- Acquisition, storage, use and disposal of radioactive material (liquid and solid) are subject to regulation and ordination of local authorities.

6. SPECIMEN COLLECTION

Sera to be analysed must be assayed soon after separation or stored in aliquotes at -20°C. Freezing and thawing must be avoided. Incorrect storage of samples can lead to loss of TSH RECEPTOR AUTO-ANTIBODIES activity. Do not use grossly hemolyzed or lipemic samples. Do not use plasma in the assay. When required, thaw the samples at room temperature and mix gently by inversion to ensure homogeneity.

Centrifuge the samples prior assay (preferably at 1,000-1,500 g in a microfuge) to remove any particulate matter.

7. ASSAY PROCEDURE WITH OR WITHOUT CALIBRATORS

1. Use of conical polystyrene tube is strongly recommended. Label the tubes for Total counts (T), Non Specific Binding (NSB), Calibrator 0 (Bo), Calibrators, Controls, and Samples in duplicate.

2. **NSB**: pipette **50 µl** of NSB solution into the corresponding tubes + **50 µl** of Calibrator 0.
3. **CAL 0**: pipette **50 µl** of calibrator 0 into the corresponding tubes.
4. **CALIBRATION CURVE**: pipette **50 µl** of each calibrator solution into their respective tubes.
- In assay procedure without calibrators do not perform this step 4.**
5. **SAMPLES AND CONTROLS**: pipette **50 µl** of Control or patient's serum into their respective tubes.
6. Add **50 µl** of TSH RECEPTOR solution to all except to the "Total count" tubes and NSB tubes. Mix all tubes with a "vortex mixer".
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature (on orbital shaker at 150 rpm)
8. Add **100 µl** of ¹²⁵I- bTSH tracer to each tube and mix all tubes with a "vortex mixer".
9. Incubate at room temperature for **2 hours** (on orbital shaker at 150 rpm).
10. Agitate the PEG solution by magnetic stirring and add **2 ml** of cold PEG solution (4°C) to each tube except for "Total count" tubes.
- IMPORTANT:**
AGITATE EACH TUBE THOROUGHLY USING A "VORTEX MIXER"
11. Centrifuge all tubes, except "Total count" tubes in a refrigerated centrifuge at approximately 2,500 x g for **30 minutes**.
12. Aspirate the supernatant carefully.
13. Count the radioactivity of all tubes for 1 minute.

ASSAY SCHEME

Tubes	Total Activity	NSB	CAL0	CAL	Controls	Samples
Reagent						
NSB	-	50 µl	-	-	-	-
Calibrator 0	-	50 µl	50 µl	-	-	-
Calibrators*	-	-	-	50 µl	-	-
Controls	-	-	-	-	50 µl	-
Samples	-	-	-	-	-	50 µl
TSH Receptor	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
- Mix gently and incubate: 10 min. R.T. shaking (150 rpm)						
Tracer	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
- Incubate : 2 h. R.T. shaking (150 rpm)						
PEG	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
- Centrifuge : 30 min. (4°C) at 2,500 g						
- Aspirate the supernatant.						
- Count the radioactivity of tubes for one minute in a gamma counter.						

* only for method with calibrators.

8. CALCULATION OF THE RESULTS

- assay validation

- Determine the average count rate (c.p.m.) for each set of duplicate tubes.
- Evaluate the percentage of **NON SPECIFIC BINDING (NSB)** as follows:

$$\frac{\text{NSB}}{\text{T}} (\%) = \frac{\text{NON SPECIFIC BINDING mean count rate}}{\text{TOTAL mean count rate}} \times 100$$

- Evaluate the **MAXIMUM BINDING RATE** used in the test as follows:

$$\frac{B_0 - \text{NSB}}{\text{T}} (\%) = \frac{\text{CALIBRATOR 0 mean count rate} - \text{NSB mean count rate}}{\text{TOTAL mean count rate}} \times 100$$

- with calibrators

First, calculate for each duplicate the average NSB-corrected counts :

Net tube counts = Average tube counts minus Average NSB counts

Calculate the binding of each duplicate as a percent of the binding of labelled TSH to TSH receptors in the presence of negative control serum (B₀) :

$$\text{Percent Bound} = \frac{\text{Net Counts}}{\text{Net B}_0 \text{ Counts}} \times 100$$

Using Logit-Log paper, plot Percent Bound on the Y-axis against Concentration on the X-axis for each calibrator. Draw a straight line through the calibration points. Concentrations for the unknowns are then estimated from the line by interpolation.

In case of computer-assisted analysis, a special program suitable for radioimmunoassays and adapted to the counter-computer system should be used.

EXAMPLE OF CALCULATION WITH CALIBRATORS

The values reported below must be considered as an example and may not be used in place of experimental data.

Description	Average cpm.	B/B ₀ (%)	TRAB conc. (U/l)
Total Activity (T)	20230	-	-
NSB	832	-	-
CAL 0	8941	100	0
CAL 1	8229	91.2	5
CAL 2	6011	63.9	15
CAL 3	3999	39.1	45
CAL 4	2441	19.8	135
CAL 5	1725	11.0	405
CONTROL 1	6005	63.8	15.9
CONTROL 2	4231	41.9	44.3
P1	7836	86.4	5.7
P2	3679	35.1	53.7
P3	2675	22.7	109.5

- without calibrators

The reference points for the assay are determined using the calibrator 0 supplied. First subtract the control receptors (NSB) from each tubes to obtain specific TSH binding. Specific bound = Tube count minus NSB
Then, calculate inhibition of TSH binding as follow :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Specific bound in the presence of test sample}}{\text{Specific bound in the presence of calibrator 0}} \right) \times 100$$

EXAMPLE OF CALCULATION WITHOUT CALIBRATORS

The values reported below must be considered as an example and may not be used in place of experimental data.

Description	Average cpm.	Inh (%)
Total Activity (T)	20230	-
NSB	832	-
CAL 0	8941	-
CONTROL 1	6005	36.2
CONTROL 2	4231	58.1
P1	7836	13.6
P2	3879	64.9
P3	2675	77.3

9. REFERENCES VALUES

It is recommended that each laboratory determines its own reference interval. Values reported below are only indicative.

- with calibrators

Lower than 9 U/I:	Negative for TSH-R auto-antibodies.
Between 9–14 U/I	Borderline
Higher than 14 U/I:	Positive for TSH-R auto-antibodies.

- without calibrators

When working without calibrators for inhibition values to consider positive results, please refer to quality control sheet included in the kit.

10. PERFORMANCE OF THE ASSAY

SPECIFICITY

Addition to the following levels of possible interfering substances caused no significant difference in quantitative TSH RECEPTOR AUTO-ANTIBODIES levels.

Substances	Concentrations
FSH	≤23000mIU/ml
LH	≤1200mIU/ml
HCG	≤140ng/ml
Thyroglobulin	≤10μg/ml
Prolactin	≤135ng/ml
TSH	≤890mIU/l
HGH	≤1000ng/ml
IgM*	≤4.39mg/ml
IgA*	≤4.23mg/ml
IgG*	≤36mg/ml

* total concentration (serum concentration + immunoglobulins added)

SENSITIVITY

Analytical sensitivity

The sensitivity was calculated based upon the calibration curve and expressed as the minimal dose showing a significant difference from the Zero Calibrator (mean value - 2 S.D.). This dose is 0.8 U/I.

Functional sensitivity

The functional assay sensitivity is the lowest value which is measured with a precision of max. 20% inter-assay variance. For the TSH-R antibodies, this value is 5.0 U/I.

PRECISION

Precision was evaluated upon intra- and inter-assay variability at different analyte concentrations.

Intra-assay

Serum	Mean	± (U/I)	S.D.	C.V. (%)	N
1	18.4	±	1.4	7.6	20
2	29.8	±	2.3	7.7	20
3	79.3	±	7.7	9.7	20

Inter-assay

Serum	Mean	± (U/I)	S.D.	C.V. (%)	N
1	17.3	±	1.7	9.8	9
2	52.5	±	2.7	5.1	9
3	93.4	±	8.6	9.2	9

ACCURACY

Accuracy of the method has been checked by the recovery and parallelism test

Recovery test: Samples, mixed with equal volumes of each calibration point, were tested.

	MEASURED (U/I)	EXPECTED (U/I)	RECOVERY (%)
S1	15	-	-
S1 + CAL 0	4	8	59.1
S1 + CAL 1	9	10	90.7
S1 + CAL 2	16	15	105.3
S1 + CAL 3	28	30	93.4
S1 + CAL 4	78	75	103.4
S1 + CAL 5	244	210	116.0
S2	76	-	-
S2 + CAL 0	45	38	117.5
S2 + CAL 1	53	41	129.3
S2 + CAL 2	52	46	114.5
S2 + CAL 3	73	61	119.5
S2 + CAL 4	135	106	127.3
S2 + CAL 5	283	241	117.7

Parallelism test: Samples with high analyte concentrations were tested at different dilution with the zero calibrator.

DILUTION	MEASURED (U/I)	EXPECTED (U/I)	RECOVERY (%)
S1 undiluted	210	-	-
1/2	123	108	113.9
1/4	63	54	116.7
1/8	27	27	100.0
S2 undiluted	139	-	-
1/2	71	69.5	102.2
1/4	37	34.7	106.6
1/8	16	17.4	92.0

This package insert is downloadable at www.zentech.be

ESPAÑOL

RADIOANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE AUTOANTICUERPOS ANTIRRECEPTORES DE-TSH EN SUERO HUMANO R-CT-50 – 50 determinaciones/R-CT-100 - 100 determinaciones

SÓLO PARA USO EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

1. APLICACIÓN CLÍNICA

El hipertiroidismo en la enfermedad de Graves es debido a autoanticuerpos dirigidos contra el receptor de tirotropina (TSH); la determinación de estos autoanticuerpos resulta valiosa para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Graves.

2. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

El análisis de AUTOANTICUERPOS ANTIRRECEPTORES DE TSH es un ensayo de radioreceptor (ERR) con el que se detectan autoanticuerpos que interfieren en la unión de la hormona estimulante del tiroides (TSH) con el receptor de TSH. En el análisis, el receptor de TSH se incuba con el suero y, tras un tiempo de preincubación con TSH marcado con I^{125} (trazador). Los autoanticuerpos y el trazador compiten por los lugares de unión en el receptor. Así, cuanto mayor sea el título del autoanticuerpo, menor será el índice de unión de TSH I^{125} al receptor. Tras la incubación, el complejo receptor-trazador precipita con polietilenglicol (PEG). Se centrifuga, se retira el sobrenadante y se procede al cotaje del precipitado. Las unidades de actividad de AUTOANTICUERPOS ANTIRRECEPTORES DE TSH en la muestra se determinan a partir de la curva de calibración y se expresan como unidades/L (U/L).

3. MATERIAL SUMINISTRADO

- Reactivos suficientes para 100 determinaciones.
- Almacene el kit y los reactivos a 2-8°C.
- La fecha de caducidad de cada reactivo se muestra en la etiqueta.

- 1. Trazador radiactivo:** 2 (4) viales con 3.0 ml (liofilizados) de bTSH- I^{125} . Reconstituya cada vial con 3.0 ml de agua destilada y mezcle con suavidad. Reconstituya el trazador al menos 10 minutos antes de iniciar el análisis. Deberá descartarse cualquier solución sobrante que no se utilice en el análisis. Contenido de radiactividad: 12,8 KBq por vial. Conservante: NaN_3 (<0,1%).
- 2. Calibradores:** **Calibrador 0:** 1 vial con 1 ml de suero humano. Conservante: NaN_3 (<0,1%). **Calibradores 1-5:** 5 viales con 0,5 ml de bTSH en suero humano. Conservante: NaN_3 (<0,1%). Los calibradores contienen 5 – 15 – 45 – 135 – 405 U/L. Los calibradores han sido estandarizados en el ensayo de receptores con respecto a MRC LATS estándar B. 1 unidad de calibración equivale, aproximadamente, a 1 unidad de MRC LATS estándar B.
- 3. Controles:** 2 viales con 0,5 ml de suero. Conservante: NaN_3 (<0,1%). **Para conocer el valor exacto, consulte la hoja de datos de control de calidad.**
- 4. Receptor de TSH:** 2 (4) viales con receptores de TSH liofilizados. Conservante: NaN_3 (<0,1%). Reconstituya cada vial con 1,5 ml de tampón frío, mezcle suavemente y deje que se disuelva durante 10 minutos hasta que el contenido sea homogéneo. Mezcle el contenido en un mezclador vórtex a la máxima velocidad para asegurar la disolución de los receptores. No reconstituya los viales que no vayan a ser utilizados inmediatamente en el análisis. Los receptores de TSH reconstituídos no son muy estables. Deberá descartarse cualquier solución sobrante que no se utilice en el análisis.
- 5. NSB (receptor de control):** 1 vial con 1 ml de solución de NSB. Conservante: NaN_3 (<0,1%).
- 6. Tampón:** 1 vial con 6,5 ml de solución tampón para reconstituir los receptores de TSH. Conservante: NaN_3 (<0,1%). La solución para reconstituir los receptores de TSH debe estar fría.
- 7. PEG:** 1(2) vial(es) de solución tampón con 100 ml de PEG. Conservante: NaN_3 (<0,1%).

4. MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO.

- Tubos de ensayo cónicos (12 x 75 mm).
- Gradillas de tubos de ensayo.
- Micropipetas automáticas ajustables con puntas desechables.
- Mezclador vórtex.
- Cilindro graduado.
- Agitador orbital
- Agua destilada
- Bomba de aspiración o aparato de lavado de tubos automático.
- Centrifugadora refrigerada (mín. 2.500 x g)
- Contador de centelleo gamma.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para conseguir resultados reproducibles, deberán observarse las siguientes normas:

- No mezcle reactivos de lotes distintos.
- No utilice reactivos después de que se haya cumplido su fecha de caducidad.
- Utilice material de vidrio totalmente limpio.
- Utilice agua destilada, almacenada en recipientes limpios.
- Evite que se produzca cualquier contaminación entre muestras; para ello, deberán utilizarse puntas desechables para cada muestra y reactivo.

Para evitar contaminación personal y ambiental, deberán observarse las siguientes precauciones:

- Utilice guantes desechables para manipular material potencialmente infeccioso y realizar el análisis.
- No pipetee los reactivos con la boca.
- Durante el análisis no fume, coma, ni beba. Tampoco debe aplicarse ningún cosmético.
- Todos los materiales de origen humano utilizados para la preparación de este kit deben haber sido sometidos a análisis de HBsAg, anti-VIH y anti-HCV, con resultados negativos. Dado que actualmente ninguna prueba puede garantizar la total ausencia de estos virus, todos los reactivos y las muestras utilizados para el análisis deben ser considerados como potencialmente infecciosos; por lo tanto, los desechos de los análisis deben ser descontaminados y eliminados con arreglo a los procedimientos de seguridad establecidos. El material desechable que sea inflamable debe ser incinerado; el material desechable no inflamable debe ser esterilizado en autoclave, al menos durante 1 hora a 121°C.
- A los desechos líquidos debe añadirse hipoclorito sódico en una concentración final al 3%. Deje que el hipoclorito actúe durante 30 minutos, como mínimo. Los desechos líquidos que contengan ácido deben ser neutralizados con cantidades de base apropiadas antes del tratamiento con hipoclorito sódico.
- Evite salpicaduras y la formación de aerosol; en caso de salpicaduras, lave cuidadosamente con una solución de hipoclorito sódico al 3% de sodio y deseché este líquido resultante de la limpieza como residuo potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen azida de sodio como conservante; para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en cañerías de plomo y cobre, los reactivos deben desecharse por los desagües correspondientes con grandes cantidades de agua.
- La adquisición, el almacenamiento, el uso y el desecho de material radioactivo (líquido y sólido) están sometidos a la normativa y las ordenanzas locales.

6. RECOGIDA DE MUESTRAS

El análisis del suero debe realizarse poco después de la separación, o bien, esto deben ser alícuotados y conservados a – 20°C. Debe evitarse la congelación y descongelación.

Un almacenamiento incorrecto de las muestras puede provocar la pérdida de actividad de los AUTOANTICUERPOS ANTIRRECEPTORES DE TSH.

No utilice muestras excesivamente hemolizadas o de alto contenido lipídico.

No utilice plasma en el análisis.

Cuando sea necesario, descongele las muestras a temperatura ambiente y mezcle suavemente por inversión para asegurar la homogeneidad.

Centrifugue las muestras antes del análisis (preferentemente a 1.000 – 1.500 g en una microfuga) para eliminar partículas.

7. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS CON O SIN CALIBRADORES

1. Se recomienda especialmente el uso de tubos cónicos de poliestireno.
Etiquete por duplicado los tubos para recuentos totales (T), unión inespecífica (NSB), calibrador 0 (Bo), calibradores, controles y muestras.

2. **NSB:** pipetee 50 µl de solución de NSB en los tubos correspondientes + 50 µl de calibrador 0.

3. **CAL 0:** pipetee 50 µl de calibrador 0 en los tubos correspondientes.

4. **CURVA DE CALIBRACIÓN:** pipetee 50 µl de cada solución de calibrador en sus tubos respectivos.

En el procedimiento de análisis sin calibradores no realice el paso 4.

5. **MUESTRAS Y CONTROLES:** pipetee 50µl de suero del paciente o de control en sus tubos respectivos.

6. Añada 50 µl de solución de RECEPTOR DE TSH en todos los tubos excepto los de recuentos totales y NSB. Homogeneizar el contenido de todos los tubos con un mezclador vórtex.

7. Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente (en un agitador orbital a 150 rpm).

8. Añada 100 µl de trazador bTSH-I¹²⁵ en cada tubo y homogeneizar el contenido de los tubos con un mezclador vórtex.

9. Incube durante 2 horas a temperatura ambiente (en un agitador orbital a 150 rpm).

10. Remueva la solución de PEG mediante agitación magnética y añada 2 ml de solución de PEG fría (4°C) a todos los tubos, excepto los de recuentos totales.

IMPORTANTE:

AGITE BIEN TODOS LOS TUBOS CON UN MEZCLADOR VÓRTEX

11. Centrifugue todos los tubos, excepto los de recuentos totales, en una centrifugadora refrigerada durante 30 minutos a 2.500 x g, aproximadamente.

12. Aspire cuidadosamente el sobrenadante.

13. Mida la radiactividad de todos los tubos durante 1 minuto.

ESQUEMA DEL ANÁLISIS

Tubos	Activi- dad total	NSB	CAL0	CAL	Contro- les	Mues- tras
Reactivo						
NSB	-	50 µl	-	-	-	-
Calibrador 0	-	50 µl	50 µl	-	-	-
Calibradores*	-	-	-	50 µl	-	-
Controles	-	-	-	-	50 µl	-
Muestras	-	-	-	-	-	50 µl
Receptor de TSH	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
- Mezclar suavemente e incubar: 10 min. T° ambiente en agitación (150 rpm)						
Trazador	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
- Llevar a cabo la incubación: 2 h. T° ambiente en agitación (150 rpm)						
PEG	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
- Centrifugar: 30 min. (4°C) a 2.500 g						
- Aspirar el sobrenadante.						
- Medir la radiactividad de los tubos durante un minuto con un contador gamma.						

* sólo para el método con calibradores.

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- validación del análisis

- Determine el promedio de recuentos (c.p.m.) para cada juego de tubos duplicados.

- Evalúe el porcentaje de **UNIÓN INESPECÍFICA** (NSB) :

$$\frac{\text{NSB}}{\text{T}} (\%) = \frac{\text{Media de recuentos de UNIÓN INESPECÍFICA}}{\text{Media de recuentos TOTAL}} \times 100$$

Evalúe la **TASA MÁXIMA DE UNIÓN** utilizada en el análisis :

$$\frac{\text{Bo} - \text{NSB}}{\text{T}} (\%) = \frac{\text{Media de recuentos CALIBRADOR 0} - \text{Media de recuentos NSB}}{\text{Media de recuentos TOTAL}} \times 100$$

- con calibradores

Calcule primero para cada duplicado el promedio del recuento de corrección de NSB.

Recuento de tubos neto = Promedio de recuentos de tubos - promedio de recuentos de NSB

Calcule la unión de cada duplicado como porcentaje de la unión de TSH marcada a los receptores TSH en presencia de suero de control negativo (Bo):

$$\text{Porcentaje de unión} = \frac{\text{Recuentos netos}}{\text{Recuento de Bo neto}} \times 100$$

Sobre papel Logit-Log, expresar mediante una gráfica el porcentaje de unión (en el eje Y) con respecto a la concentración (en el eje X) para cada calibrador. Trace una línea recta a través de los puntos de calibración. Las concentraciones de las incógnitas se calcularán por interpolación con la recta de calibración trazada.

En caso de análisis asistido por ordenador, debe utilizarse un programa especial válido para radioinmunoanálisis y adaptado al equipo contador.

EJEMPLO DE CÁLCULO CON CALIBRADORES

Los valores que se indican a continuación son simplemente ilustrativos y no deben emplearse en lugar de los datos experimentales.

Descripción	Promedio cpm.	B/B0 (%)	Conc. TRAB (U/I)
Actividad total (T)	20230	-	-
NSB	832	-	-
CAL 0	8941	100	0
CAL 1	8229	91,2	5
CAL 2	6011	63,9	15
CAL 3	3999	39,1	45
CAL 4	2441	19,8	135
CAL 5	1725	11,0	405
CONTROL 1	6005	63,8	15,9
CONTROL 2	4231	41,9	44,3
P1	7836	86,4	5,7
P2	3679	35,1	53,7
P3	2675	22,7	109,5

- sin calibradores

Los puntos de referencia para el análisis se determinan mediante el calibrador 0 suministrado. En primer lugar, reste los receptores de control (NSB) de cada tubo para obtener la unión de TSH específica. Unión específica = Recuento de tubo - NSB

A continuación, calcule la inhibición de la unión de TSH :

$$\text{Inhibición}(\%) = \left(1 - \frac{\text{Unión específica en presencia de muestra para análisis}}{\text{Unión específica en presencia de calibrador 0}} \right) \times 100$$

EJEMPLO DE CÁLCULO SIN CALIBRADORES

Los valores que se indican a continuación son simplemente ilustrativos y no deben emplearse en lugar de los datos experimentales.

Descripción	Promedio cpm.	Inh (%)
Actividad total (T)	20230	-
NSB	832	-
CAL 0	8941	-
CONTROL 1	6005	36,2
CONTROL 2	4231	58,1
P1	7836	13,6
P2	3879	64,9
P3	2675	77,3

9. VALORES DE REFERENCIA

Es recomendable que cada laboratorio determine su propio intervalo de referencia. Los valores que se indican a continuación son meramente indicativos.

- con calibradores

Menos de 9 U/l:	Negativo en autoanticuerpos para TSH-R.
Entre 9-14 U/l	Intermedio
Más de 14 U/l:	Positivo en autoanticuerpos para TSH-R.

- sin calibradores

Cuando se trabaje sin calibradores, para la determinación e resultados positivos consultar la hoja de control de calidad incluida en el kit.

10. RENDIMIENTO DEL ANÁLISIS

ESPECIFICIDAD

La adición de sustancias posiblemente interferentes en las cantidades indicadas a continuación no dió lugar a diferencias significativas en los niveles de AUTOANTICUERPOS ANTIRRECEPTORES DE TSH.

Sustancias	Concentraciones
FSH	≤23000mIU/ml
LH	≤1200mIU/ml
hCG	≤140ng/ml
Tiroglobulina	≤10µg/ml
Prolactina	≤135ng/ml
TSH	≤890mIU/l
HGH	≤1000ng/ml
IgM*	≤4,39mg/ml
IgA*	≤4,23mg/ml
IgG*	≤36mg/ml

* concentración total (concentración en suero + inmunoglobulinas añadidas)

SENSIBILIDAD

Sensibilidad analítica

La sensibilidad se calculó a partir de la curva de calibración y se expresó como dosis mínima con una diferencia significativa con respecto al calibrador cero (valor promedio + 2 D. E.). Esta dosis es de 0,8 U/l.

Sensibilidad funcional

La sensibilidad funcional del análisis es el valor inferior que se mide con una precisión de varianza máxima de un 20% entre análisis. Para los anticuerpos de TSH-R, este valor es de 5,0 U/l.

PRECISIÓN

La precisión se evaluó sobre la variabilidad intraensayo y entre análisis, con concentraciones de analito distintas.

Intraensayo

Suero	Media	± (U/l)	D.E.	C.V. (%)	N
1	18,4	±	1,4	7,6	20
2	29,8	±	2,3	7,7	20
3	79,3	±	7,7	9,7	20

Entre análisis

Suero	Media	± (U/l)	D.E.	C.V. (%)	N
1	17,3	±	1,7	9,8	9
2	52,5	±	2,7	5,1	9
3	93,4	±	8,6	9,2	9

EXACTITUD

La exactitud del método ha sido evaluada mediante pruebas de recuperación y paralelismo.

Prueba de recuperación

Se analizaron muestras mezcladas con volúmenes iguales de cada calibrador.

	MEDIDO (U/l)	PREVISTO (U/l)	RECUPERACIÓN (%)
S1	15	-	-
S1 + CAL 0	4	8	59,1
S1 + CAL 1	9	10	90,7
S1 + CAL 2	16	15	105,3
S1 + CAL 3	28	30	93,4
S1 + CAL 4	78	75	103,4
S1 + CAL 5	244	210	116,0
S2	76	-	-
S2 + CAL 0	45	38	117,5
S2 + CAL 1	53	41	129,3
S2 + CAL 2	52	46	114,5
S2 + CAL 3	73	61	119,5
S2 + CAL 4	135	106	127,3
S2 + CAL 5	283	241	117,7

Prueba de paralelismo

Los sueros con una elevada concentración de analito fueron analizados a distintas diluciones con el calibrador cero.

DILUCIÓN	MEDIDO (U/l)	PREVISTO (U/l)	RECUPERACIÓN (%)
S1 sin diluir	210	-	-
1/2	123	108	113,9
1/4	63	54	116,7
1/8	27	27	100,0
S2 sin diluir	139	-	-
1/2	71	69,5	102,2
1/4	37	34,7	106,6
1/8	16	17,4	92,0

Información disponible en la página web: www.zentech.be.

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ RRA ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΝΤΙ-TSH ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ R-CT-50 – 50 προσδιορισμοί/R-CT-100 - 100 προσδιορισμοί

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO

1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Ο υπερθυρεοειδισμός στη νόσο Graves οφείλεται σε αυτοαντισώματα που κατευθύνονται ενάντια στον υποδοχέα θυρεοτροπίνης (TSH) και η μέτρηση αυτών των αυτοαντισωμάτων είναι πολύτιμη για τη διάγνωση και αντιμετώπιση της νόσου Graves.

2. ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ο προσδιορισμός ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ TSH είναι ένας προσδιορισμός RRA, ο οποίος ανιχνεύει αυτοαντισώματα, που παρεμβαίνουν στη δέσμευση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) στον υποδοχέα της TSH. Στή μέθοδο, ο υποδοχέας της TSH επωάζεται με ορό και, μετά από ένα χρόνο προκαταρκτικής επώασης, με TSH σημασμένη με ¹²⁵I (ιχνηθέτης). Τα αυτοαντισώματα και ο ιχνηθέτης ανταγωνίζονται για τις θέσεις δέσμευσης πάνω στον υποδοχέα. Κατά συνέπεια, όσο πιο υψηλός είναι ο τίτλος των αυτοαντισωμάτων, τόσο πιο χαμηλή η τιμή της TSH που έχει σημασθεί με ¹²⁵I, η οποία δεσμεύεται στον υποδοχέα. Μετά την επώαση, το σύμπλοκο υποδοχέα-ιχνηθέτη καθιζάνει με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και μετράται το ίζημα. Οι μονάδες δραστηριότητας των ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ TSH στο δείγμα προσδιορίζονται από την καμπύλη βαθμονόμησης και εκφράζονται ως μονάδες/I (U/I).

3. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

- Τα αντιδραστήρια επαρκούν για 50 (100) προσδιορισμούς.
- Φυλάσσετε το kit και τα αντιδραστήρια στους 2-8°C.
- Η ημερομηνία λήξης κάθε αντιδραστήριου αναγράφεται στην ετικέτα.

1. Ραδιενεργός ιχνηθέτης: 2 (4) φιαλίδια που περιέχουν 3.0 ml (λυοφιλοποιημένα) κεκαθαρμένης ¹²⁵I-bTSH. Ανασυστήστε κάθε φιαλίδιο με 3.0 ml απεσταγμένου νερού και αναμείξτε απαλά. Ανασυστήστε τον ιχνηθέτη τουλάχιστον 10 λεπτά πριν από την έναρξη του προσδιορισμού. Τυχόν επιπλέον διάλυμα, που δε χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό, πρέπει να απορρίπτεται. Περιεχόμενο ραδιενέργειας: 12,8 kBq ανά φιαλίδιο. Συντηρητικό: NaN₃ (< 0,1%).

2. Βαθμονομητές: Βαθμονομητής 0: 1 φιαλίδιο που περιέχει 1 ml ανθρώπινου ορού. Συντηρητικό: NaN₃ (< 0,1%). **Βαθμονομητές 1-5:** 5 φιαλίδια που περιέχουν 0,5 ml bTSH σε ανθρώπινο ορό. Συντηρητικό: NaN₃ (< 0,1%). Οι βαθμονομητές περιέχουν 5 – 15 – 45 – 135 – 405 U/I. Οι βαθμονομητές έχουν τυποποιηθεί στον προσδιορισμό υποδοχέα έναντι του Προτύπου B MRC LATS. 1 μονάδα βαθμονόμησης είναι περίπου ισοδύναμη με 1 μονάδα Προτύπου B MRC LATS.

3. Οροί έλεγχου: 2 φιαλίδια που περιέχουν 0,5 ml ορού. Συντηρητικό: NaN₃ (< 0,1%). **Για την ακριβή τιμή, ανατρέξτε στην τιμή που αναγράφεται στο φύλλο δεδομένων Ποιοτικού Ελέγχου.**

4. Υποδοχέας TSH: 2 (4) φιαλίδια που περιέχουν λυοφιλοποιημένους υποδοχείς TSH. Συντηρητικό: NaN₃ (< 0,1%). Ανασυστήστε κάθε φιαλίδιο με 1,5 ml κρύου ρυθμιστικού διαλύματος, αναμείξτε απαλά και αφήστε να διαλυθεί επί 10 λεπτά μέχρι να λάβει χώρα ομοιόμορφη εναιώρηση του περιεχομένου. Αναμείξτε τα περιεχόμενα σε ένα vortex σε πλήρη ταχύτητα για να διασφαλίσετε τη διάλυση των υποδοχέων. Μην υποβάλλετε σε ανασύσταση φιαλίδια, τα οποία δε θα χρησιμοποιηθούν αμέσως στον προσδιορισμό. Οι ανασυσταθέντες υποδοχείς της TSH δεν είναι πολύ σταθεροί. Τυχόν επιπλέον διάλυμα, που δε χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό, πρέπει να απορρίπτεται.

- 5. NSB (έλεγχος υποδοχέα:** 1 φιαλίδιο που περιέχει 1 ml διαλύματος NSB. Συντηρητικό: NaN₃ (< 0,1%).
- 6. Ρυθμιστικό διάλυμα:** 1 φιαλίδιο που περιέχει 6,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών για ανασύσταση των υποδοχέων της TSH. Συντηρητικό: NaN₃ (< 0,1%). Να χρησιμοποιείτε πάντα κρύο διάλυμα για την ανασύσταση των υποδοχέων της TSH.
- 7. PEG:** 1 (2) φιαλίδια με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 100 ml διαλύματος πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Συντηρητικό: NaN₃ (< 0,1%).

4. ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Κωνικά δοκιμαστικά σωληνάρια (12 x 75 mm)
- Βάσεις δοκιμαστικών σωληναρίων.
- Διαβαθμισμένος κύλινδρος.
- Απεσταγμένο νερό.
- Ρυθμιζόμενες, αυτόματες μικροπιπέτες με αναλώσιμα ρύγχη.
- Αναμεικτής στροβιλισμού (τύπου vortex)
- Αναδευτήρας τροχιακής κίνησης
- Αντλία αναρρόφησης ή αυτοματοποιημένη συσκευή πλύσης σωληναρίων.
- Συσκευή φυγοκέντρωσης με σύστημα ψύξης (ελάχ. 2500 x g)
- Μετρητής σπινθηρισμών γ ακτινοβολίας.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Προκειμένου να πάρετε αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, θα πρέπει να τηρηθούν οι ακόλουθοι κανόνες:

- Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια διαφορετικών παρτίδων.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Χρησιμοποιείτε πολύ καθαρά γυάλινα δοχεία.
- Χρησιμοποιείτε απεσταγμένο νερό, αποθηκευμένο σε καθαρούς περιέκτες.
- Αποφύγετε τη μόλυνση από δείγμα σε δείγμα. Για το σκοπό αυτό, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για κάθε δείγμα και αντιδραστήριο ρύγχη μιας χρήσης.

Προκειμένου να αποφευχθεί η μόλυνση σε ανθρώπους και στο περιβάλλον, θα πρέπει να ληφθούν οι ακόλουθες προφυλάξεις:

- Χρησιμοποιείτε γάντια μιας χρήσης όταν χειρίζεστε δυνητικώς μολυσματικό υλικό και εκτελείτε τον προσδιορισμό.
- Μην διανέμετε τα αντιδραστήρια με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας.
- Μην καπνίζετε, μην τρώτε, μην πίνετε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού.
- Όλα τα υλικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αυτού του kit εξετάστηκαν και βρέθηκαν αρνητικά για HBsAg, αντι-HIV και αντι-HCV. Επειδή επί του παρόντος καμία εξέταση δεν μπορεί να εγγυηθεί την πλήρη απουσία των ιών αυτών, όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικώς μολυσματικά. Επομένως, τα απόβλητα μετά τον προσδιορισμό πρέπει να υποβάλλονται σε απολύμανση και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις καθιερωμένες διαδικασίες ασφαλείας. Τα εύφλεκτα υλικά μίας χρήσης πρέπει να αποτεφρώνονται. Τα μη εύφλεκτα υλικά μίας χρήσης πρέπει να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο επί τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία 121°C.
- Στα υγρά απόβλητα πρέπει να προστίθεται υποχλωριώδες νάτριο σε τελική συγκέντρωση 3%. Αφήστε το υποχλωριώδες νάτριο να δράσει επί τουλάχιστον 30 λεπτά. Τα υγρά απόβλητα που περιέχουν οξύ πρέπει να υποβάλλονται σε εξουδετέρωση με τις κατάλληλες ποσότητες βάσης πριν την επεξεργασία με το υποχλωριώδες νάτριο.
- Αποφύγετε το πισίσιμα και το σχηματισμό αερολύματος. Σε περίπτωση που χυθεί το υγρό, πλύνετε προσεκτικά με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 3% και απορρίψτε αυτό το καθαριστικό υγρό ως δυνητικώς μολυσματικό υλικό.
- Μερικά αντιδραστήρια περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Για να αποφύγετε τη συσσώρευση εκρηκτικών αζιδίων μετάλλων στους σωλήνες της αποχέτευσης που είναι από μόλυβδο και χαλκό, τα αντιδραστήρια πρέπει να απορρίπτοντας ξεπλένοντας ταυτόχρονα την αποχέτευση με μεγάλες ποσότητες νερού.

- Η λήψη, χρήση και απόρριψη ραδιενεργών υλικών (υγρών και στερεών) υπόκειται στους κανονισμούς και τις διατάξεις των τοπικών αρχών.

6. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Οι οροί που πρόκειται να αναλυθούν πρέπει να υποβάλλονται σε προσδιορισμό αμέσως μετά το διαχωρισμό ή να φυλάσσονται σε κλάσματα σε θερμοκρασία -20°C. Η κατάψυξη και η απόψυξη πρέπει να αποφεύγονται.

Ακατάλληλη φύλαξη των δειγμάτων μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της δραστηριότητας των ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ TSH.

Μη χρησιμοποιείτε κατά πολύ αιμολυμένα ή λιπαιμικά δείγματα.

Μη χρησιμοποιείτε πλάσμα στον προσδιορισμό.

Όταν απαιτείται, αποψύξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου και αναμείξτε απαλά με αναστροφή για να εξασφαλίσετε ομοιογένεια.

Υποβάλετε σε φυγοκέντρηση τα δείγματα πριν από τον προσδιορισμό (κατά προτίμηση σε 1.000-1.500 g σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης) για να απομακρύνετε τυχόν σωματίδια.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕ Ή ΧΩΡΙΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ

1. Η χρήση κωνικών σωληναρίων από πολυστυρένιο συνιστάται ιδιαίτερα.

Σημάνετε τα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I (T), τη μη ειδική δέσμευση (NSB), το βαθμονομητή 0 (Bo), τους βαθμονομητές, τους ορούς ελέγχου και τα δείγματα εις διπλούν.

2. **NSB:** Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από το διάλυμα NSB μέσα στα αντίστοιχα σωληνάρια + 50 μl από το βαθμονομητή 0.

3. **CAL 0:** Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από το βαθμονομητή 0 στα αντίστοιχα σωληνάρια.

4. **ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ:** Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από κάθε διάλυμα βαθμονομητή στα αντίστοιχα σωληνάρια τους.

Κατά τη διαδικασία χωρίς βαθμονομητές, μην εκτελέσετε το βήμα 4.

5. **ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ:** Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από τον ορό ελέγχου ή τον ορό ασθενούς στα αντίστοιχα σωληνάρια τους.

6. Προσθέστε 50 μl διαλύματος υποδοχέα TSH σε όλα τα σωληνάρια, με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total") και την NSB. Αναμείξτε όλα τα σωληνάρια σε "vortex".

7. Επώαστε επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (με αναδευτήρα τροχιακής κίνησης στις 150 rpm).

8. Προσθέστε 100 μl ιχνηθέτη ^{125}I - bTSH σε κάθε σωληνάριο και αναμείξτε όλα τα σωληνάρια με ένα "vortex".

9. Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (με αναδευτήρα τροχιακής κίνησης στις 150 rpm).

10. Αναδεύσατε το διάλυμα PEG με μαγνητικό αναδευτήρα και προσθέστε 2 ml κρύου διαλύματος PEG (4°C) σε κάθε σωληνάριο εκτός από εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ:

ΑΝΑΔΕΥΣΑΤΕ ΚΑΛΑ ΚΑΘΕ ΣΩΛΗΝΑΡΙΟ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΕΝΑ "VORTEX"

11. Φυγοκεντρήστε σε περίπου 2.500 x g, επί 30 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, όλα τα σωληνάρια εκτός από εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").

12. Αναρροφήστε το υπερκείμενο προσεκτικά.

13. Μετρήστε τη ραδιενέργεια όλων των σωληναρίων επί 1 λεπτό.

ΣΧΗΜΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σωληνάρια	Μέτρηση ιχνηθέτη ^{125}I (total)	NSB	CAL0	CAL	Οροί ελέγχου	Δείγματα
Αντιδραστήριο						
NSB	-	50 μl	-	-	-	-
Βαθμονομητής 0	-	50 μl	50 μl	-	-	-
Βαθμονομητές*	-	-	-	50 μl	-	-
Οροί ελέγχου	-	-	-	-	50 μl	-
Δείγματα	-	-	-	-	-	50 μl
Υποδοχέας TSH	-	-	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
- Αναμείξτε απαλά και επώαστε: 10 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου, ανάδευση (150 rpm)						
Ιχνηθέτης	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
- Επώαστε: 2 ώρες, θερμοκρασία δωματίου, ανάδευση (150 rpm)						
PEG	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
- Φυγοκεντρίστε: 30 λεπτά (4°C) σε 2.500 g						
- Αναρροφήστε το υπερκείμενο.						
- Μετρήστε τη ραδιενέργεια των σωληναρίων για ένα λεπτό σε μετρητή γ ακτινοβολίας.						

* μόνο για μέθοδο με βαθμονομητές.

8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Αξιολόγηση της μεθόδου

- Προσδιορίστε τη μέση τιμή κρούσεων (c.p.m.) για κάθε σει διπλών σωληναρίων.

- Υπολογίστε το επί τοις εκατό ποσοστό της **ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ** (NSB) ως εξής:

$$\frac{\text{NSB}}{\text{T}} (\%) = \frac{\text{Μέση τιμή CPM ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ}}{\text{Μέση τιμή CPM TOTAL}} \times 100$$

• Αξιολογήστε το **ΜΕΓΙΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ** που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό ως εξής:

$$\frac{\text{Bo} - \text{NSB}}{100} (\%) = \frac{\text{Μέση τιμή CPM ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗ 0} - \text{Μέση τιμή CPM NSB}}{\text{Μέση τιμή CPM TOTAL}} \times$$

- με βαθμονομητές

Πρώτα, υπολογίστε για κάθε διπλό τις μέσες διορθωμένες με NSB μετρήσεις:

Καθαρές μετρήσεις σωληναρίων = Μέσες μετρήσεις σωληναρίων μείον Μέσες μετρήσεις NSB

Υπολογίστε τη δέσμευση κάθε επανάληψης ως ποσοστό της δέσμευσης της σημασμένης TSH σε υποδοχείς TSH παρουσία αρνητικού ορού ελέγχου (Bo) :

$$\% \text{ ποσοστό δέσμευσης} = \frac{\text{Καθαρές μετρήσεις}}{\text{Καθαρές μετρήσεις Bo}} \times 100$$

Χρησιμοποιώντας χαρτί γραφημάτων Logit-Log, σχεδιάστε το επί τοις εκατό ποσοστό δέσμευσης στον άξονα των Y έναντι της συγκεντρώσεως στον άξονα των X για καθένα από τους βαθμονομητές. Τραβήξτε μια ευθεία γραμμή μέσω των σημείων βαθμονόμησης. Οι συγκεντρώσεις για τα άγνωστα υπολογίζονται στη συνέχεια από τη γραμμή μέσω αναγωγής.

Σε περίπτωση ανάλυσης με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, πρέπει να χρησιμοποιηθεί ειδικό πρόγραμμα κατάλληλο για ραδιοανσοσποπροσδιορισμούς και προσαρμοσμένο στο σύστημα μετρητή-ηλεκτρονικού υπολογιστή.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΜΕ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ

Οι τιμές που αναφέρονται πιο κάτω πρέπει να θεωρηθούν ως παράδειγμα και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί πειραματικών δεδομένων

Περιγραφή	Μέση τιμή cpm.	B/B ₀ (%)	Συγκ. TRAB (U/I)
Μέτρηση ιχνηθέτη ¹²⁵ I (T)	20230	-	-
NSB	832	-	-
CAL 0	8941	100	0
CAL 1	8229	91,2	5
CAL 2	6011	63,9	15
CAL 3	3999	39,1	45
CAL 4	2441	19,8	135
CAL 5	1725	11,0	405
ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ 1	6005	63,8	15,9
ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ 2	4231	41,9	44,3
P1	7836	86,4	5,7
P2	3679	35,1	53,7
P3	2675	22,7	109,5

- χωρίς βαθμονομητές

Τα σημεία αναφοράς για την μέθοδο καθορίζονται χρησιμοποιώντας τον παρεχόμενο βαθμονομητή 0. Πρώτα αφαιρέστε τους υποδοχείς ελέγχου (NSB) από κάθε σωληνάριο για να λάβετε την ειδική δέσμευση της TSH. Ειδική δέσμευση = Μέτρηση σωληναρίου μείον NSB
Κατόπιν, υπολογίστε την παρεμπόδιση της δέσμευσης της TSH ως εξής:

Ειδική δέσμευση εν τη παρουσία του εξεταζομένου δείγματος

Παρεμπόδιση (%) = (1 -

Ειδική δέσμευση εν τη παρουσία του βαθμονομητή 0

) x 100

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΧΩΡΙΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ

Οι τιμές που αναφέρονται πιο κάτω πρέπει να θεωρηθούν ως παράδειγμα και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί πειραματικών δεδομένων

Περιγραφή	Μέση τιμή cpm.	Αναστ. (%)
Μέτρηση ιχνηθέτη ¹²⁵ I (T)	20230	-
NSB	832	-
CAL 0	8941	-
ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ 1	6005	36,2
ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ 2	4231	58,1
P1	7836	13,6
P2	3879	64,9
P3	2675	77,3

9. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Συνιστάται κάθε εργαστήριο να προσδιορίσει το δικό του πεδίο τιμών αναφοράς. Οι τιμές που αναφέρονται πιο κάτω είναι απλώς ενδεικτικές.

- με βαθμονομητές

Κάτω από 9 U/I:	Αρνητικό για αυτοαντισώματα έναντι του TSH-R.
Μεταξύ 9–14 U/I	Οριακό
Μεγαλύτερο από 14 U/I:	Θετικό για αυτοαντισώματα έναντι του TSH-R.

- χωρίς βαθμονομητές

Όταν δουλεύετε χωρίς βαθμονομητές για τιμές παρεμπόδισης προκειμένου να αξιολογήσετε θετικά αποτελέσματα, παρακαλούμε ανατρέξτε στο φύλλο ποιοτικού ελέγχου που περιλαμβάνεται στο kit.

10. ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Η προσθήκη των ακόλουθων επιπέδων πιθανών ουσιών που επιδρούν δεν προκάλεσε σημαντική διαφορά στα ποσοτικά επίπεδα των ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ TSH.

Ουσίες	Συγκεντρώσεις
FSH	≤23000mIU/ml
LH	≤1200mIU/ml
HCG	≤140ng/ml
Θυρεοσφαιρίνη	≤10μg/ml
Προλακτίνη	≤135ng/ml
TSH	≤890mIU/I
HGH	≤1000ng/ml
IgM*	≤4.39mg/ml
IgA*	≤4.23mg/ml
IgG*	≤36mg/ml

* ολική συγκέντρωση (συγκέντρωση ορού + προστεθείσες ανοσοσφαιρίνες)

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Αναλυτική ευαισθησία
Η ευαισθησία υπολογίστηκε με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης και εκφράστηκε ως η ελάχιστη δόση που δείχνει σημαντική διαφορά από το μηδενικό βαθμονομητή (μέση τιμή - 2 T.A.) Η δόση αυτή είναι 0,8 U/I.

Λειτουργική ευαισθησία
Η λειτουργική ευαισθησία της μεθόδου είναι η χαμηλότερη τιμή που μετράται με ακρίβεια μέγιστης διακύμανσης 20% μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών. Για τα αντισώματα έναντι του TSH-R, η τιμή αυτή είναι 5,0 U/I.

ΑΚΡΙΒΕΙΑ
Η ακρίβεια αξιολογήθηκε με βάση τη μεταβλητότητα για τον ίδιο προσδιορισμό και μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλυόμενης ουσίας.

Για τον ίδιο προσδιορισμό

Ορός	Μέση τιμή ± (U/I)	Τυπ. απόκλιση (U/I)	Σ.Δ. (%)	N
1	18,4 ±	1,4	7,6	20
2	29,8 ±	2,3	7,7	20
3	79,3 ±	7,7	9,7	20

Μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών

Ορός	Μέση τιμή ± (U/I)	Τυπ. απόκλιση (U/I)	Σ.Δ. (%)	N
1	17,3 ±	1,7	9,8	9
2	52,5 ±	2,7	5,1	9
3	93,4 ±	8,6	9,2	9

ΟΡΘΟΤΗΤΑ
Η ορθότητα της μεθόδου έχει αξιολογηθεί με δοκιμασίες ανάκτησης και παραλληλισμού.

Δοκιμασία ανάκτησης
Υποβλήθηκαν σε δοκιμασία δείγματα αναμεμιγμένα με ίσους όγκους από κάθε βαθμονομητή.

	ΜΕΤΡΗΘΕΙΣΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (U/l)	ΑΝΑΜΕΝΟΜΗ ΝΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (U/l)	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)
S1	15	-	-
S1 + CAL 0	4	8	59,1
S1 + CAL 1	9	10	90,7
S1 + CAL 2	16	15	105,3
S1 + CAL 3	28	30	93,4
S1 + CAL 4	78	75	103,4
S1 + CAL 5	244	210	116,0
S2	76	-	-
S2 + CAL 0	45	38	117,5
S2 + CAL 1	53	41	129,3
S2 + CAL 2	52	46	114,5
S2 + CAL 3	73	61	119,5
S2 + CAL 4	135	106	127,3
S2 + CAL 5	283	241	117,7

Δοκιμασία παραλληλισμού

Οροί με υψηλή συγκέντρωση αναλυόμενης ουσίας εξετάστηκαν σε διαφορετικές αραιώσεις με το μηδενικό βαθμονομητή.

ΑΡΑΙΩΣΗ	ΜΕΤΡΗΘΕΙΣΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (U/l)	ΑΝΑΜΕΝΟΜΗ ΕΝΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (U/l)	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)
S1 μη αραιωμένο	210	-	-
1/2	123	108	113,9
1/4	63	54	116,7
1/8	27	27	100,0
S2 μη αραιωμένο	139	-	-
1/2	71	69,5	102,2
1/4	37	34,7	106,6
1/8	16	17,4	92,0

Μπορείτε να κατεβάσετε το παρόν ένθετο φυλλάδιο οδηγιών χρήσης μέσω του διαδικτύου από την ιστοσελίδα www.zentech.be

FRANÇAIS

MÉTHODE RADIORÉCEPTEUR POUR LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE DES AUTO-ANTICORPS ANTI-RÉCEPTEUR DE LA TSH DANS LE SÉRUM HUMAIN

R-CT-50 – 50 Déterminations/R-CT-100 – 100 Déterminations

UNIQUEMENT A USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO

1. APPLICATIONS CLINIQUES

L'hyperthyroïdie dans la maladie de Graves est due à des auto-anticorps dirigés contre les récepteurs de la thyrotropine (ou thyroïdostimuline) (TSH). La mesure de ces auto-anticorps est précieuse dans le diagnostic et la gestion de la maladie de Graves

2. PRINCIPE DE L'ANALYSE

Le dosage des AUTO-ANTICORPS ANTI-RÉCEPTEUR DE LA TSH est une méthode radiorécepteur (RRA) qui détecte les auto-anticorps interférant avec la liaison de la thyroïdostimuline (l'hormone de stimulation de la thyroïde ou TSH) à son récepteur. Dans le dosage, le récepteur de la TSH est incubé avec le sérum et, après un premier temps d'incubation, on ajoute de la TSH marquée à l'I¹²⁵ (traceur). Les auto-anticorps et le traceur entrent en compétition pour les sites de liaison sur les récepteurs. C'est pourquoi plus le titre en auto-anticorps est élevé moins la TSH I¹²⁵ se lie au récepteur. Après une incubation, le complexe récepteur-traceur est précipité avec du polyéthylène glycol (PEG). Après centrifugation, le surnageant est retiré et le précipité est compté. Les unités de l'activité des AUTO-ANTICORPS ANTI-RÉCEPTEUR DE LA TSH de l'échantillon sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage et exprimées en unités/L (U/l).

3. RÉACTIFS FOURNIS AVEC LA TROUSSE

- Les réactifs sont suffisants pour 50 (100) déterminations.
- Stocker les kits et les réactifs à 2-8°C.
- La date d'expiration de chaque réactif est inscrite sur l'étiquette.

- 1. Traceur radioactif :** 2 (4) flacons contenant 3,0 ml de bTSH-I¹²⁵ purifiée (lyophilisée). Reconstituer chacun des flacons avec 3,0 ml d'eau distillée et mélanger doucement. Reconstituer le traceur au moins 10 minutes avant le début de l'analyse. Il faut jeter toute solution en excès non utilisée durant l'analyse. Radioactivité : 12,8 KBq par flacon. Conservateur: NaN₃ (<0,1%).
- 2. Calibrateurs: Calibrateur 0 :** 1 flacon contenant 1 ml de sérum humain. Conservateur: NaN₃ (<0,1%). **Calibrateurs 1-5:** 5 flacons contenant 0,5 ml de bTSH dans du sérum humain. Conservateur: NaN₃ (<0,1%). Les calibrateurs contiennent 5 – 15 – 45 – 135 – 405 U/L. Les calibrateurs ont été standardisés dans ce dosage des récepteurs par rapport au standard B LATs MRC. 1 unité de calibration équivaut à peu près à 1 unité du standard B LATs MRC.
- 3. Contrôles:** 2 flacons contenant 0,5 ml de sérum. Conservateur: NaN₃ (<0,1%). **Pour la valeur exacte, se référer à la fiche technique du contrôle de qualité.**
- 4. Récepteur TSH:** 2 (4) flacons contenant des récepteurs de la TSH lyophilisés. Conservateur: NaN₃ (<0,1%). Reconstituer chacun des flacons avec 1,5 ml de tampon froid, mélanger doucement et permettre la dissolution pendant au moins 10 minutes jusqu'à ce que la suspension soit uniforme. Mélanger les contenus sur un agitateur vortex réglé à pleine vitesse afin d'assurer la dissolution des récepteurs. Ne pas reconstituer les flacons qui ne seront pas immédiatement utilisés dans l'analyse. Les récepteurs de la TSH reconstitués ne sont pas très stables. Toute solution en excès non utilisée durant le dosage doit être jetée.
- 5. NSB (récepteur de contrôle):** 1 flacon contenant 1 ml de solution NSB (liaison non spécifique). Conservateur: NaN₃ (<0,1%).
- 6. Tampon:** 1 flacon contenant 6,5 ml de solution tamponnée pour la reconstitution des récepteurs de la TSH. Conservateur: NaN₃ (<0,1%). Toujours utiliser une solution froide pour reconstituer les récepteurs de la TSH.
- 7. PEG:** 1 (2) flacon(s) de solution tamponnée contenant 100 ml de PEG. Conservateur: NaN₃ (<0,1%).

4. MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Tubes d'analyse coniques (12 x 75 mm).
- Portoir pour tubes à essai.
- Cylindre gradué.
- Eau distillée.
- Micropipettes automatiques réglables avec pointes jetables.
- Vortex.
- Agitateur orbital.
- Pompe d'aspiration ou dispositif de lavage automatique.
- Centrifugeuse réfrigérée (min 2500 g x).
- Compteur de rayons gamma.

5. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Afin d'obtenir des résultats reproductibles, les règles suivantes doivent être respectées:

- Ne pas mélanger les réactifs de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs après leur date de péremption.
- Utiliser de la verrerie parfaitement propre.
- Utiliser de l'eau distillée conservée dans des réservoirs propres.
- Éviter toute contamination des échantillons. Pour ce faire, utiliser des embouts jetables pour chaque échantillon et réactif.

Afin d'éviter une contamination du personnel ou de l'environnement, les précautions suivantes doivent être respectées:

- Utiliser des gants jetables lors de l'utilisation de matériel potentiellement infectieux et de la réalisation du dosage.
- Ne pas pipeter les réactifs avec la bouche.
- Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller durant le dosage.
- Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation de cette trousse a été testé et trouvé négatif pour les HBsAg, anti-HIV et anti-HCV. Étant donné qu'aucun test actuel ne peut garantir totalement l'absence de ces virus, tous les échantillons et réactifs utilisés pour le dosage doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Tous les déchets produits lors du dosage doivent dès lors être décontaminés et éliminés en respectant les procédures de sécurité. Le matériel jetable combustible doit être stérilisé à l'autoclave pendant au moins 1 heure à 121°C. Il faut ajouter de l'hypochlorite de soude aux déchets liquides de manière à obtenir une concentration finale de 3%. Laisser agir l'hypochlorite pendant au moins 30 minutes. Les déchets liquides contenant de l'acide doivent être neutralisés avec la quantité adéquate de base avant d'être traités à l'hypochlorite de soude.
- Éviter les éclaboussures et la formation d'aérosol. En cas d'éclaboussure, laver soigneusement avec une solution d'hypochlorite de soude à 3% et éliminer ce liquide de lavage avec les déchets potentiellement infectieux. Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme agent conservateur. Afin de prévenir la formation d'azotures de métal explosifs dans les canalisations de plomb ou de cuivre, éliminer les réactifs en rinçant les canalisations avec une grande quantité d'eau.
- L'acquisition, le stockage, l'utilisation et l'élimination de matériel radioactif (liquide et solide) sont soumis à la réglementation des autorités locales.

6. ÉCHANTILLONS A TESTER

Les sérums à analyser doivent l'être immédiatement après la séparation ou ils doivent être conservés en aliquotes à -20°C. Il faut éviter les congélations-décongélations.

Une conservation incorrecte des échantillons peut mener à une perte d'activité des AUTO-ANTICORPS ANTI-RÉCEPTEUR DE LA TSH.

Ne pas utiliser des échantillons totalement hémolysés ou lipémiques.

Ne pas utiliser de plasma pour ce dosage.

Si c'est nécessaire, amener les échantillons à température ambiante et mélanger-les doucement en les renversant afin d'assurer l'homogénéité.

Centrifuger les échantillons avant le dosage (de préférence entre 1.000 et 1.500 g dans une microcentrifugeuse) afin d'enlever toute substance particulière.

7. PROCÉDURE D'ANALYSE AVEC OU SANS CALIBRATEUR

1. Il est fortement recommandé d'utiliser des tubes coniques en polystyrène.

Étiqueter les tubes pour l'activité totale (T), les liaisons non spécifiques (NSB), le calibrateur 0 (Bo), les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double.

2. **NSB:** pipeter **50 µl** de solution NSB dans les tubes correspondants + **50 µl** de calibrateur 0.

3. **CAL 0:** pipeter **50 µl** de calibrateur 0 dans les tubes correspondants.

4. **COURBE D'ÉTALONNAGE:** pipeter **50 µl** de chacune des solutions de calibrateur dans leurs tubes respectifs.

Dans la procédure d'analyse sans calibrateurs, ne pas réaliser l'étape 4.

5. **ÉCHANTILLONS ET CONTRÔLES:** pipeter **50 µl** de contrôle ou de sérum de patient dans leurs tubes respectifs.

6. Ajouter **50 µl** de solution du RÉCEPTEUR de la TSH dans tous les tubes excepté les tubes pour l'"activité totale" et les tubes NSB. Mélanger tous les tubes sur un "agitateur vortex".

7. Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante (sur un agitateur orbital à 150 tpm).

8. Ajouter **100 µl** de traceur bTSH-¹²⁵ à chacun des tubes et mélanger tous les tubes sur un "agitateur vortex".

9. Incuber à température ambiante pendant **2 heures** (sur un agitateur orbital à 150 tpm).

10. Mélanger la solution PEG par agitation magnétique et ajouter **2 ml** de solution PEG froide (4°C) à chacun des tubes excepté les tubes pour l'"activité totale".

IMPORTANT:

MÉLANGER À FOND CHACUN DES TUBES EN UTILISANT UN "AGITATEUR VORTEX"

11. Centrifuger tous les tubes, excepté les tubes pour l'"activité totale", dans une centrifugeuse réfrigérée à approximativement 2.500 x g pendant **30 minutes**.

12. Aspirer précautionneusement le surnageant.

13. Compter la radioactivité dans tous les tubes pendant 1 minute.

SCHÉMA DU DOSAGE

Tubes Réactif	Activité Totale	NSB	CAL0	CAL	Contrôles	Échant.
NSB	-	50 µl	-	-	-	-
Calibrateur 0	-	50 µl	50 µl	-	-	-
Calibrateurs*	-	-	-	50 µl	-	-
Contrôles	-	-	-	-	50 µl	-
Échantillons	-	-	-	-	-	50 µl
Récepteur de la TSH	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
- Mélanger doucement et incuber pendant 10 min. à T.A. sous agitation (150 tpm)						
Traceur	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
- Incubation : 2 h. T.A. sous agitation (150 tpm)						
PEG	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
- centrifuger : 30 min. (4°C) à 2,500 g						
- Aspirer le surnageant et bien décanter.						
- Compter la radioactivité des tubes pendant une minute dans un compteur gamma.						

* seulement pour la méthode avec calibrateurs.

8. CALCUL DES RÉSULTATS

- validation de l'analyse

- Déterminer le taux de comptage moyen (c.p.m.) pour chaque ensemble de tubes analysés en double.

- Évaluer le pourcentage de **LIAISON NON SPÉCIFIQUE** (NSB) de la manière suivante:

$$\frac{\text{NSB}}{\text{T}} (\%) = \frac{\text{taux de comptage moyen de la LIAISON NON SPÉCIFIQUE}}{\text{taux de comptage moyen TOTAL}} \times 100$$

- Évaluer le **TAUX DE LIAISON MAXIMUM** utilisé dans l'analyse de la manière suivante:

$$\frac{B_0 - \text{NSB}}{T} (\%) = \frac{\text{taux de comptage moyen du CALIBRATEUR 0} - \text{taux de comptage moyen de la NSB}}{\text{taux de comptage moyen TOTAL}} \times 100$$

- avec calibrateurs

Calculer d'abord, pour toutes les analyses réalisées en double, les comptages moyens par minute corrigés pour la liaison non spécifique.

Comptages nets du tube = comptages moyens du tube moins les comptages NSB moyens

Calculer la liaison de chacune des analyses réalisées en double comme un pourcentage de la liaison de la TSH marquée aux récepteurs de la TSH en présence du sérum de contrôle négatif (B₀) :

$$\text{Pourcentage de liaison} = \frac{\text{comptages nets}}{\text{comptages nets du } B_0} \times 100$$

Sur un papier logarithmique, reporter, pour chacun des calibrateurs, le pourcentage de liaison sur l'axe des Y en fonction de la concentration sur l'axe des X. Tracer une ligne droite à travers les points de calibration. Les concentrations inconnues sont ensuite estimées par interpolation à partir de la ligne.

En cas d'analyse assistée par ordinateur, il faut utiliser un programme particulier, approprié aux essais radio-immunologiques et adapté au compteur-ordinateur.

EXEMPLE DE CALCUL AVEC CALIBRATEURS

Les valeurs rapportées ci-dessous doivent être considérées comme un exemple et ne peuvent être utilisées à la place des données expérimentales.

Description	Moyenne cpm	B/B ₀ (%)	Anti-TSH-R (U/l)
Activité Totale (T)	20230	-	-
NSB	832	-	-
CAL 0	8941	100	0
CAL 1	8229	91,2	5
CAL 2	6011	63,9	15
CAL 3	3999	39,1	45
CAL 4	2441	19,8	135
CAL 5	1725	11,0	405
CONTROLE 1	6005	63,8	15,9
CONTROLE 2	4231	41,9	44,3
P1	7836	86,4	5,7
P2	3679	35,1	53,7
P3	2675	22,7	109,5

- sans calibrateurs

Les points de référence de l'analyse sont déterminés en utilisant le calibrateur 0 fourni. D'abord soustraire les récepteurs du contrôle (NBS) de chacun des tubes pour obtenir la liaison spécifique de la TSH. La liaison spécifique = le comptage du tube moins la NSB. Calculer ensuite l'inhibition de la liaison de la TSH de la manière suivante :

$$\text{Inhibition } (\%) = \left(1 - \frac{\text{Liaison spécifique en présence de l'échantillon à analyser}}{\text{Liaison spécifique en présence du calibrateur 0}} \right) \times 100$$

EXEMPLE DE CALCUL SANS CALIBRATEUR

Les valeurs rapportées ci-dessous doivent être considérées comme un exemple et ne peuvent être utilisées à la place des données expérimentales.

Description	Moyenne cpm	Inhibition (%)
Activité Totale (T)	20230	-
NSB	832	-
CAL 0	8941	-
CONTROLE 1	6005	36,2
CONTROLE 2	4231	58,1
P1	7836	13,6
P2	3879	64,9
P3	2675	77,3

9. VALEURS DE RÉFÉRENCE

Il est recommandé que chaque laboratoire détermine ses propres intervalles de référence. Les valeurs rapportées ci-dessous le sont seulement à titre indicatif.

- avec calibrateur

Inférieur à 9 U/l:	Négatif pour les auto-anticorps anti-récepteur de la TSH.
Entre 9 et 14 U/l:	Limite.
Supérieur à 14 U/l:	Positif pour les auto-anticorps anti-récepteur de la TSH.

- sans calibrateur

Lorsque vous travaillez sans calibrateur pour les valeurs d'inhibition, veuillez vous référer à la feuille de contrôle de qualité incluse dans la trousse pour déterminer les résultats positifs.

10. PERFORMANCE DU DOSAGE

SPÉCIFICITÉ

L'addition des taux repris ci-dessous de substances pouvant interférer ne provoque pas de différence significative dans les taux quantitatifs des AUTO-ANTICORPS ANTI-RÉCEPTEUR DE LA TSH.

Substances	Concentrations
FSH	≤23000 mUI/ml
LH	≤1200 mUI/ml
HCG	≤140 ng/ml
Thyroglobuline	≤10 µg/ml
Prolactine	≤135 ng/ml
TSH	≤890 mUI/L
HGH	≤1000 ng/ml
IgM*	≤4,39 mg/ml
IgA*	≤4,23 mg/ml
IgG*	≤36 mg/ml

* concentration totale (concentration du sérum + immunoglobulines ajoutées)

SENSIBILITÉ

Sensibilité analytique

La sensibilité a été calculée sur base de la courbe d'étalonnage et exprimée comme dose minimale montrant une différence significative du Calibre Zéro (valeur moyenne - 2 D.S.). Cette dose est 0.8 U/l.

Sensibilité fonctionnelle

La sensibilité fonctionnelle d'analyse est la valeur la plus basse qui est mesurée avec une précision de maximum 20% de variation inter-analyse. Pour les anticorps anti-récepteurs de la TSH, cette valeur est 5.0 U/l.

PRECISION

La précision a été évaluée sur la variabilité intra et inter-analyse à différentes concentrations de l'analyte.

Intra-analyse

Serum	Moyenne	± (U/I)	D.S.	C.V. (%)	N
1	18,4	±	1,4	7,6	20
2	29,8	±	2,3	7,7	20
3	79,3	±	7,7	9,7	20

Inter-analyse

Serum	Moyenne	± (U/I)	D.S.	C.V. (%)	N
1	17,3	±	1,7	9,8	9
2	52,5	±	2,7	5,1	9
3	93,4	±	8,6	9,2	9

EXACTITUDE

L'exactitude de la méthode a été vérifiée par les tests de récupération et de parallélisme.

Test de récupération

Les échantillons, mélangés avec les volumes égaux de chaque calibre, ont été testés.

Ajouté	Prévu (U/I)	Mesuré (U/I)	Récupération (%)
S1	15	-	-
S1 + CAL 0	4	8	59,1
S1 + CAL 1	9	10	90,7
S1 + CAL 2	16	15	105,3
S1 + CAL 3	28	30	93,4
S1 + CAL 4	78	75	103,4
S1 + CAL 5	244	210	116,0
S2	76	-	-
S2 + CAL 0	45	38	117,5
S2 + CAL 1	53	41	129,3
S2 + CAL 2	52	46	114,5
S2 + CAL 3	73	61	119,5
S2 + CAL 4	135	106	127,3
S2 + CAL 5	283	241	117,7

Test de parallélisme.

Les sérums de concentration élevée en analyte ont été testés à différentes dilutions avec le Calibre Zéro.

Dilution	Prévu (U/I)	Mesuré (U/I)	Récupération (%)
S1 non dilué	210	-	-
1/2	123	108	113,9
1/4	63	54	116,7
1/8	27	27	100,0
S2 non dilué	139	-	-
1/2	71	69,5	102,2
1/4	37	34,7	106,6
1/8	16	17,4	92,0

Ce mode opératoire peut être téléchargé sur notre site www.zentech.be

ITALIANO

DOSAGGIO RADIORECETTIVO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEGLI AUTOANTICORPI DIRETTI CONTRO I RECETTORI ANTI-TSH NEL SIERO UMANO R-CT-50 – 50 Determinazione / R-CT-100 – 100 Determinazione

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

1. APPLICAZIONI CLINICHE

L'ipertiroidismo nella malattia di Graves è determinato dalla presenza degli autoanticorpi diretti contro il recettore della Tireotropina o ormone tireotropo (TSH) e la determinazione di questi autoanticorpi è utile nella diagnosi e nel trattamento della malattia di Graves.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il dosaggio degli autoanticorpi del recettore del TSH è un metodo basato sulla dosaggio radiorecettivo (RRA) che rileva gli autoanticorpi che interferiscono con il legame che si forma tra l'ormone stimolante la tiroide (TSH) e il recettore del TSH. Durante il test, il recettore del TSH viene incubato con il siero e, dopo un tempo di preincubazione, viene incubato con il TSH marcato con Iodio¹²⁵ (Tracciante). Gli autoanticorpi e il tracciante competono per i siti di legame specifici sul recettore. Di conseguenza, più alta è la concentrazione dell'autoanticorpo, più basso è il legame che si forma tra il TSH marcato con I¹²⁵ e il recettore. Al termine dell'incubazione, il complesso recettore-tracciante viene fatto precipitare con il polietilenglicole (PEG). Dopo la centrifugazione, si elimina il supernatante e si analizza il precipitato. L'attività degli Autoanticorpi del Recettore del TSH presente nel campione è calcolata su una curva di calibrazione ed espressa in unità/L (U/L).

3. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

- I reagenti sono sufficienti per 50 (100) determinazioni.
 - Conservare il kit e i reagenti a 2-8°C.
 - La data di scadenza di ciascun reagente è indicata sull'etichetta.
- Tracciante Radioattivo:** 2 (4) flaconi contenenti bTSH-I125 (liofilizzato) purificato. Ricostituire ogni flacone con 3 ml di acqua distillata e mescolare delicatamente. Ricostituire il tracciante almeno 10 minuti prima dell'inizio del dosaggio. Eliminare la soluzione in eccesso che non viene utilizzata per l'analisi. Livello di radioattività: 12.8 KBq per flacone. Conservante: NaN₃ (<0,1%).
 - Calibratori:** **Calibratore 0:** 1 flacone contenente 1 ml di siero umano. Conservante: NaN₃ (<0,1%). **Calibratori da 1 a 5:** 5 flaconi contenenti 0.5 ml di bTSH in siero umano. Conservante: NaN₃ (<0,1%). I calibratori contengono 5 – 15 – 45 – 135 – 405 U/L. I calibratori sono stati tarati sullo MRC LATS-B standard. 1 unità di calibrazione equivale a circa 1 unità dello MRC LATS-B standard.
 - Sieri di Controllo:** 2 flaconi contenenti 0.5 ml di siero. Conservante: NaN₃ (<0,1%). **Per la concentrazione esatta, fare riferimento al valore scritto sulle schede dei dati del Controllo Qualità.**
 - Recettore TSH:** 2 (4) flaconi contenenti recettori del TSH liofilizzati. Conservante: NaN₃ (<0,1%). Ricostituire ogni flacone con 1.5 ml di soluzione tampone fredda, mescolare delicatamente e lasciar sciogliere per 10 minuti finché il contenuto non è sospeso in modo uniforme. Mescolare il contenuto su vortex alla massima velocità per garantire lo scioglimento completo dei recettori. Non ricostituire i flaconi che non verranno utilizzati immediatamente nel dosaggio. I recettori del TSH ricostituiti non sono stabili a lungo. Eliminare la soluzione in eccesso che non viene utilizzata per l'analisi.
 - NSB (Recettore di Controllo):** 1 flacone contenente 1 ml di soluzione NSB. Conservante: NaN₃ (<0,1%).

6. **Tampone:** 1 flacone contenente 6.5 ml di soluzione tampone per la ricostituzione dei recettori del TSH. Conservante: NaN_3 (<0,1%). Per la ricostituzione dei recettori del TSH, usare sempre la soluzione a freddo.
7. **PEG:** 1(2) flacone/i di soluzione tampone contenente 100 ml di PEG. Conservante: NaN_3 (<0,1%).

4. MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- Provette coniche (12 x 75 mm).
- Portaprovette
- Cilindro graduato
- Acqua distillata.
- Micropipette automatiche e regolabili a puntali intercambiabili
- Vortex
- Agitatore orbitale
- Pompa di aspirazione o dispositivo di lavaggio automatico.
- Centrifuga refrigerata (min 2500 x g)
- Contatore gamma a scintillazione

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per ottenere risultati corretti e riproducibili, è necessario osservare le seguenti norme:

- Non mescolare reagenti di lotti differenti.
- Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.
- Usare vetreria perfettamente pulita.
- Usare acqua distillata o deionizzata, conservata in recipienti perfettamente puliti.
- Evitare accuratamente contaminazioni tra campioni; a tal fine è consigliabile usare pipette con puntali monouso per ogni campione e per ogni reattivo.

Per evitare contaminazioni di tipo fisico o ambientali, è necessario osservare le seguenti norme di sicurezza:

- Utilizzare guanti monouso durante la manipolazione di materiale potenzialmente infetto e durante il dosaggio.
- Non pipettare i reagenti con la bocca.
- Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- La manipolazione di sostanze radioattive deve essere eseguita in aree specificamente predisposte.
- Le sostanze radioattive devono essere conservate nei loro contenitori originali in un'area specificamente predisposta.
- E' necessario compilare un registro che indichi dettagliatamente l'ingresso, la conservazione e l'eliminazione di tutto il materiale radioattivo ricevuto.
- E' necessario eliminare immediatamente qualunque contaminazione radioattiva secondo le procedure stabilite.
- Tutti i materiali di origine umana utilizzati nella preparazione del presente kit sono stati testati e trovati negativi per HBsAg, anti-HIV e anti-HCV. Siccome nessun test attualmente disponibile garantisce l'assenza di questi virus, tutti i campioni di sangue ed i reagenti usati per questo dosaggio devono essere considerati potenzialmente infetti; quindi i rifiuti ottenuti dal dosaggio devono essere decontaminati e smaltiti in accordo alle procedure di legge. Il materiale monouso combustibile deve essere incenerito, quello non combustibile deve essere sterilizzato in autoclave per almeno 1 ora a 121 °C. I rifiuti liquidi devono essere addizionati ad ipoclorito di sodio fino ad ottenere una concentrazione finale del 3%. Lasciare che l'acido agisca per almeno 30 minuti. I rifiuti liquidi contenenti acido devono essere neutralizzati con quantità opportune di soluzioni basiche, prima di essere trattate con l'ipoclorito di sodio.
- Evitare la produzione di schizzi e la formazione di aerosol; qualora ciò si verificasse ripulire accuratamente con ipoclorito di sodio al 3% e trattare il rifiuto liquido come residuo potenzialmente infetto.
- Alcuni reagenti contengono sodio azide come conservante; per prevenire la formazione di azidi di metallo altamente esplosivi con il contatto con il piombo ed il rame delle tubature, far scorrere abbondante acqua sui reagenti eliminati.
- L'acquisto, la detenzione, l'impiego e lo smaltimento di materiale radioattivo (sia solido che liquido) sono soggetti alle disposizioni locali previste dalle autorità legislative.

6. RACCOLTA DEI CAMPIONI

I sieri da analizzare devono essere dosati subito dopo la separazione o conservati in aliquote a -20°C. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.

Una conservazione dei campioni inadeguata può condurre ad una perdita di attività degli Autoanticorpi del Recettore del TSH.

Non utilizzare campioni fortemente emolizzati o lipemici.

Non usare plasma per eseguire il test.

Se richiesto, scongelare i campioni a temperatura ambiente e mescolare delicatamente per inversione per garantire l'omogeneità.

Centrifugare i campioni prima del dosaggio (preferibilmente a 1.000-1.500 g in una microcentrifuga) per rimuovere l'eventuale materiale particellato.

7. PROCEDURA OPERATIVA CON E SENZA CALIBRATORI

1. Si raccomanda vivamente l'utilizzo di provette coniche in polistirene.
Preparare le provette per l'Attività Totale (T), il Legame Non Specifico (NSB), il Calibratore 0 (Bo), i Calibratori, i Controlli e i Campioni in duplicato.
2. **NSB:** Dispensare **50 µl** di soluzione di NSB nelle provette corrispondenti + **50 µl** di Calibratore 0.
3. **CAL 0:** Dispensare **50 µl** di calibratore 0 nelle provette corrispondenti.
4. **CURVA DI CALIBRAZIONE:** Dispensare **50 µl** di ciascun calibratore nelle rispettive provette
Nella procedura senza calibratori, non eseguire il punto n°4.
5. **CAMPIONI E SIERI CONTROLLO:** Dispensare **50 µl** di siero di Controllo o di campioni nelle rispettive provette
6. Aggiungere **50 µl** di Recettore TSH in tutte le provette, ad eccezione di quella per l' Attività Totale e l' NSB. Mescolare tutte le provette su vortex.
7. Incubare per **10 minuti** a temperatura ambiente (in agitazione a 150 giri/min).
8. Aggiungere **100 µl** di tracciante $^{125}\text{-bTSH}$ in ogni provetta e mescolare tutte le provette su vortex.
9. Incubare a temperatura ambiente per **2 ore** (in agitazione a 150 giri/min).
10. Agitare la soluzione PEG mediante agitazione magnetica e aggiungere **2 ml** di soluzione PEG fredda (4°C) in ogni provetta, tranne quelle per l' Attività Totale.
IMPORTANTE:
AGITARE COMPLETAMENTE OGNI PROVETTA UTILIZZANDO UN "VORTEX"
11. Centrifugare tutte le provette, ad eccezione di quella per l' Attività Totale, in una centrifuga refrigerata a circa 2.500 x g per **30 minuti**.
12. Aspirare con attenzione il supernatante.
13. Contare la radioattività di tutte le provette per 1 minuto.

SCHEMA DI DOSAGGIO

Provette Reagente	Attività Totale	NSB	CAL0	CAL	Sieri contr.	Campioni
NSB	-	50 µl	-	-	-	-
Calibratore 0	-	50 µl	50 µl	-	-	-
Calibratori*	-	-	-	50 µl	-	-
Sieri	-	-	-	-	50 µl	-
Controllo	-	-	-	-	-	-
Campioni	-	-	-	-	-	50 µl
Recettore del TSH	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
- Mescolare delicatamente ed incubare. 10 min a temperatura ambiente in agitazione (150 giri/min)						
Tracciante	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubare: 2 ore a temperatura ambiente in agitazione (150 giri/min)						
PEG	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
- Centrifugare : 30 min. (4°C) a 2.500 g						
- Aspirare il supernatante.						
- Contare la radioattività delle provette per un minuto con un contatore gamma.						

* solo per il metodo con i calibratori.

8. CALCOLO DEI RISULTATI

- Validazione del test

- Determinare il valore di conta media (CPM) per ogni serie di provette in duplicato.
- Valutare la percentuale di LEGAME ASPECIFICO (NSB) come segue:

$$\frac{\text{NSB}}{T} (\%) = \frac{\text{Valore Medio della Conta del LEGAME ASPECIFICO}}{\text{Valore Medio della Conta TOTALE}} \times 100$$

- Valutare la **PERCENTUALE MASSIMA DI LEGAME** usata nel test come segue:

$$\frac{B_0 - \text{NSB}}{T} (\%) = \frac{\text{Valore Medio della Conta del CALIBRATORE 0} - \text{Valore Medio della Conta dell' NSB}}{\text{Valore Medio della Conta del TOTALE}} \times 100$$

- con i calibratori

Dapprima calcolare per ogni duplicato la media delle conte sottratte dell'NSB :

Conta Netta delle provette = Conta Media - Conta Media dell' NSB

Calcolare il legame di ogni duplicato come percentuale di legame del TSH marcato verso i recettori del TSH in presenza del Siero di Controllo Negativo (B₀) :

$$\text{Percentuale di Legame} = \frac{\text{Conte Nette}}{\text{Conte Nette } B_0} \times 100$$

Tracciare su carta millimetrata doppia scala logaritmica (logit-log) un grafico che evidenzi, per ciascun calibratore, la Percentuale di Legame sull'asse delle ordinate (Y) e la Concentrazione sull'asse delle ascisse (X). Tracciare una linea retta che definisca approssimativamente l'andamento dei punti di calibrazione. Le concentrazioni incognite dei campioni vengono calcolate interpolando i cpm sulla retta.

Nel caso di analisi elaborate da computer, occorre usare un programma dedicato a metodiche radioimmunologiche e adattato al computer del contatore usato.

ESEMPIO DI CALCOLO CON I CALIBRATORI

I valori riportati nella tabella sottostante devono essere considerati solo un esempio e non possono essere utilizzati al posto dei dati sperimentali.

Descrizione	CPM medio	B/B ₀ (%)	conc. TRAB (U/l)
Attività Totale (T)	20230	-	-
NSB	832	-	-
CAL 0	8941	100	0
CAL 1	8229	91.2	5
CAL 2	6011	63.9	15
CAL 3	3999	39.1	45
CAL 4	2441	19.8	135
CAL 5	1725	11.0	405
CONTROLLO 1	6005	63.8	15.9
CONTROLLO 2	4231	41.9	44.3
P1	7836	86.4	5.7
P2	3679	35.1	53.7
P3	2675	22.7	109.5

- senza calibratori

I punti di riferimento per il dosaggio vengono determinati mediante il calibratore 0. Sottrarre i recettori di controllo (NSB) da ogni provetta per ottenere il legame specifico con il TSH. Legame specifico = Conta delle provette – NSB.

Calcolare quindi l'inibizione del legame del TSH, come segue:

$$\text{Inibizione} (\%) = \left(1 - \frac{\text{Legame specifico in presenza del campione analizzato}}{\text{Legame specifico in presenza del calibratore 0}} \right) \times 100$$

ESEMPIO DI CALCOLO SENZA I CALIBRATORI

I valori riportati nella tabella sottostante devono essere considerati solo un esempio e non possono essere utilizzati al posto dei dati sperimentali.

Descrizione	CPM medio	Inh (%)
Attività Totale (T)	20230	-
NSB	832	-
CAL 0	8941	-
CONTROLLO 1	6005	36.2
CONTROLLO 2	4231	58.1
P1	7836	13.6
P2	3879	64.9
P3	2675	77.3

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Si raccomanda ad ogni laboratorio di calcolare il proprio intervallo di riferimento. I valori sotto riportati sono solo indicativi.

- con i calibratori

< 9 U/l:	Negativo
9 – 14 U/l:	Borderline
> 14 U/l:	Positivo

- senza calibratori

Nel caso in cui il dosaggio venga effettuato senza calibratori per valutare i risultati positivi dei valori di inibizione, fare riferimento alla scheda del controllo di qualità inclusa nel kit.

10. CARATTERISTICHE METODOLOGICHE

SPECIFICITÀ

L'aggiunta delle sostanze sottoindicate, potenzialmente interferenti, non hanno causato alcuna differenza significativa nelle quantità di AUTOANTICORPI DEL RECETTORE DEL TSH.

Sostanze	Concentrazioni
FSH	≤23000mIU/ml
LH	≤1200mIU/ml
HCG	≤140ng/ml
Tiroglobulina	≤10μg/ml
Prolattina	≤135ng/ml
TSH	≤890mIU/l
HGH	≤1000ng/ml
IgM*	≤4.39mg/ml
IgA*	≤4.23mg/ml
IgG*	≤36mg/ml

* concentrazione totale (concentrazione serica + immunoglobuline aggiunte)

SENSIBILITÀ

Sensibilità analitica

La sensibilità è stata calcolata sulla curva di calibrazione ed è definita come la dose minima alla quale si ha una differenza significativa dal Calibratore Zero (valore medio – 2 D.S.). Questa dose è di 0.8 U/l.

Sensibilità funzionale

La sensibilità funzionale del dosaggio è definita come il valore più basso che viene misurato con una variabilità inter-saggio (precisione) massima del 20%. Per gli anticorpi del TSH-R, questo valore è pari a 5.0 U/l.

PRECISIONE

La precisione è stata valutata sulla variabilità intra- ed inter-saggio a diverse concentrazioni di analista.

Intra-saggio

Siero	Media	± (U/I)	D.S.	C.V. (%)	N
1	18.4	±	1.4	7.6	20
2	29.8	±	2.3	7.7	20
3	79.3	±	7.7	9.7	20

Inter-saggio

Siero	Media	± (U/I)	D.S.	C.V. (%)	N
1	17.3	±	1.7	9.8	9
2	52.5	±	2.7	5.1	9
3	93.4	±	8.6	9.2	9

ACCURATEZZA

L'accuratezza del metodo è stata controllata mediante il test di recupero e di parallelismo.

Test di recupero: Sono stati testati campioni mescolati con pari volumi di ciascun calibratore.

	MISURATO (U/I)	ATTESO (U/I)	RECUPERO (%)
S1	15	-	-
S1 + CAL 0	4	8	59,1
S1 + CAL 1	9	10	90,7
S1 + CAL 2	16	15	105,3
S1 + CAL 3	28	30	93,4
S1 + CAL 4	78	75	103,4
S1 + CAL 5	244	210	116,0
S2	76	-	-
S2 + CAL 0	45	38	117,5
S2 + CAL 1	53	41	129,3
S2 + CAL 2	52	46	114,5
S2 + CAL 3	73	61	119,5
S2 + CAL 4	135	106	127,3
S2 + CAL 5	283	241	117,7

Test di parallelismo: Sono stati testati campioni con alte concentrazioni di analita a diverse diluizioni con il Calibratore Zero.

DILUIZIONE	MISURATO (U/I)	ATTESO (U/I)	RECUPERO (%)
S1 non diluito	210	-	-
1/2	123	108	113.9
1/4	63	54	116.7
1/8	27	27	100.0
S2 non diluito	139	-	-
1/2	71	69.5	102.2
1/4	37	34.7	106.6
1/8	16	17.4	92.0

È possibile scaricare questo foglietto illustrativo al seguente indirizzo www.zentech.be

NEDERLANDS

RADIORECEPTORASSAY VOOR DE KWANTITATIEVE BEPALING VAN AUTOANTILICHAMEN VOOR ANTI-TSH- RECEPTOREN IN HUMAAN SERUM R-CT-50 – 50 tests / R-CT-100 – 100 tests

UITSLUITEND VOOR DIAGNOSTISCH GEBRUIK IN VITRO

1. KLINISCHE TOEPASSINGEN

Hyperthyreoïdie bij de ziekte van Graves wordt veroorzaakt door autoantilichamen, gericht tegen de thyreotropine-receptor (TSH-receptor), en de meting van deze autoantilichamen is waardevol bij de diagnose en de behandeling van de ziekte van Graves.

2. PRINCIPE VAN DE ASSAY

De assay voor AUTOANTILICHAMEN VOOR TSH-RECEPTOREN is een radioreceptorassay (RRA), die autoantilichamen detecteert die interfereren met de binding van het thyroïdstimulerend hormoon (TSH) aan de TSH-receptor. In de assay wordt de TSH-receptor met serum geïncubeerd en na een voorafgaande incubatie wordt TSH (tracer) gelabeld met ¹²⁵I. De autoantilichamen en de tracer concurreren voor de bindingsplaatsen op de receptor. Dus hoe hoger de autoantichaamtiter, hoe minder ¹²⁵I TSH aan de receptor wordt gebonden. Na de incubatie wordt het receptor-tracer-complex met polyethyleenglycol (PEG) geprecipiteerd. Na het centrifugeren wordt het supernatans verwijderd en het precipitaat geteld. De eenheden van de activiteit van de AUTOANTILICHAMEN VOOR DE TSH-RECEPTOR in het monster worden op basis van de kalibratiecurve bepaald en in eenheden/l (E/l) uitgedrukt.

3. GELEVERDE MATERIALEN

- De reagentia zijn voldoende voor 100 tests.
- Bewaar de kit en de reagentia bij 2 – 8 °C.
- De houdbaarheidsdatum van elk reagens staat op het etiket vermeld.

- Radioactieve tracer:** 2 (4) flacons met 3.0 ml (gelyofiliseerd) gezuiverd ¹²⁵I-bTSH. Reconstitueer elke flacon met 3.0 ml gedestilleerd water en meng voorzichtig. Reconstitueer de tracer ten minste 10 min. vóór aanvang van de test. Het teveel aan oplossing, die niet in de test wordt gebruikt, moet worden afgevoerd. Radioactieve inhoud: 12,8 kBq per flacon. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%).
- Kalibratoren: Kalibrator 0:** 1 flacon met 1 ml humaan serum. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%). **Kalibrator 1 - 5:** 5 flacons met 0,5 ml bTSH in humaan serum. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%). De kalibratoren bevatten 5 – 15 – 45 – 135 – 405 E/l. Bij de receptorassay werden de kalibratoren gestandaardiseerd tegenover MRC LATS Standard B. Eén eenheid van de kalibratie komt ongeveer overeen met 1 eenheid van MRC LATS Standard B.
- Controles:** 2 flacons met 0,5 ml serum. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%). **Raadpleeg de waarde vermeld op het informatieblad van de kwaliteitscontrole voor de exacte waarde.**
- TSH-receptor:** 2 (4) flacons met gelyofiliseerde TSH-receptoren. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%). Reconstitueer elke flacon met 1,5 ml koude buffer, meng voorzichtig en laat gedurende 10 minuten oplossen totdat de inhoud gelijkmatig is gesuspenderd. Meng de inhoud op een vortexmenger op volle kracht om te garanderen dat de receptoren zijn opgelost. Geen flacons reconstitueren die niet onmiddellijk in de assay worden gebruikt. Gereconstitueerde TSH-receptoren zijn niet lang houdbaar. Het teveel aan oplossing, die niet in de test wordt gebruikt, moet worden afgevoerd.
- NSB (controle-receptor):** 1 flacon met 1 ml NSB-oplossing. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%).
- Buffer:** 1 flacon met 6,5 ml gebufferde oplossing om de TSH-receptoren te reconstitueren. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%). Gebruik altijd een koude oplossing om de TSH-receptoren te reconstitueren.
- PEG:** 1 (2) flacon(s) gebufferde oplossing met 100 ml PEG. Bewaarmiddel: NaN₃ (< 0,1%).

4. VEREISTE MAAR NIET GELEVERDE MATERIALEN

- Conische reageerbuisjes (12 x 75 mm).
- Rek voor proefbuisjes.
- Maatcilinder.
- Gedestilleerd water.
- Regelbare, automatische micropipetten met wegwerptippen.
- Vortexmenger.
- Ronschudapparaat.
- Aspiratiepomp of geautomatiseerd apparaat om de buisjes te wassen.
- Gekoelde centrifuge (min. 2.500 x g).
- Gamma scintillatieteller.

5. WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

Om reproduceerbare resultaten te verkrijgen, moeten de volgende regels in acht worden genomen:

- Reagentia van verschillende charges mogen niet worden gemengd.
- Gebruik de reagentia niet langer dan de aangegeven vervaldatum.
- Gebruik glaswerk, dat grondig werd gereinigd is.
- Gebruik gedestilleerd water, dat wordt bewaard in een propere verpakking.
- Vermijd besmettingen bij monsters onderling. Gebruik daarom wegwerptips voor elk monster en reagens.

Om persoonlijke besmetting en besmetting van de omgeving te vermijden, dienen de volgende voorzorgsmaatregelen in acht te worden genomen:

- Gebruik wegwerphandschoenen als u met potentieel infectieus materiaal werkt en als u het assay uitvoert.
- Pipetteer de reagentia niet met de mond.
- Niet roken, eten, drinken of cosmetica aanbrengen tijdens het assay.
- Alle materialen van menselijke oorsprong die voor de bereiding van deze kit worden gebruikt, gaven een negatief resultaat voor HbsAg, anti-HIV en anti-HCV. Aangezien op dit moment geen enkele test de volledige afwezigheid van deze virussen kan garanderen, dienen alle voor dit assay gebruikte monsters en reagentia als potentieel infectieus materiaal te worden beschouwd. Daarom dient het afval naar aanleiding van de test te worden ontsmet en te worden weggegooid in overeenstemming met de vastgelegde veiligheidsprocedures. Ontvlambare wegwerpmaterialen moeten worden verbrand; niet-ontvlambare wegwerpmaterialen moeten gedurende ten minste 1 uur bij 121 °C worden gesteriliseerd in een autoclaaf.
- Aan vloeibaar afval moet natriumhypochloriet met een eindconcentratie van 3% worden toegevoegd. Laat het hypochloriet gedurende ten minste 30 minuten werken. Vloeibaar afval dat een zuur bevat, moet met de desbetreffende hoeveelheid van een base worden geneutraliseerd alvorens te behandelen met natriumhypochloriet.
- Vermijd spatten en aerosolvorming. Indien er werd gemorst, dient er zorgvuldig met een oplossing van 3% natriumhypochloriet te worden gewassen en dient deze reinigingsvloeistof te worden weggegooid als zijnde potentieel infectieus afval.
- Sommige reagentia bevatten natriumazide als conserveermiddel. Om ophoping van explosieve metaalaziden in loden en koperen afvoerleidingen te vermijden, dienen reagentia te worden afgevoerd door de afvoerleidingen ruimschoots met water na te spoelen.
- Aankoop, opslag, gebruik en vernietiging van (vloeibare en vaste) radioactieve materialen zijn onderworpen aan de voorschriften en verordeningen van de lokale autoriteiten.

6. MONSTERNAME

De te analyseren sera moeten kort na de scheiding worden geanalyseerd of bij -20 °C in aliquots worden bewaard. Herhaaldelijk invriezen en ontdooien moet worden vermeden. Indien de monsters niet correct worden bewaard, kan dat leiden tot een verlies van de activiteit van de AUTOANTILICHAMEN VOOR DE TSH-RECEPTOREN. In hoge mate gehemolyseerde of lipemische monsters mogen niet worden gebruikt.

Geen plasma gebruiken in de assay.

De monsters, indien noodzakelijk, bij kamertemperatuur ontdooien en voorzichtig mengen door ze om te keren om homogeniteit te garanderen.

Centrifugeer de monsters vóór de assay (bij voorkeur bij 1.000 - 1.500 g in een microcentrifuge) om deeltjes te verwijderen.

7. ASSAYPROCEDURE MET OF ZONDER KALIBRATOREN

1. Het gebruik van conische buisjes van polystyreen wordt ten zeerste aanbevolen.

Label de buisjes voor de totaal tellingen (T), niet-specifieke binding (NSB), kalibrator 0 (Bo), kalibratoren, controles en monsters in tweevoud.

2. **NSB:** pipetteer 50 µl NSB-oplossing in de betreffende buisjes + 50 µl kalibrator 0.

3. **KAL 0:** pipetteer 50 µl kalibrator 0 in de betreffende buisjes.

4. **KALIBRATIECURVE:** pipetteer 50 µl van elke kalibratoroplossing in de betreffende buisjes.

Bij de assayprocedure zonder kalibratoren voert u stap 4 niet uit.

5. **MONSTERS EN CONTROLES:** pipetteer 50 µl controle of serum van de patiënt in de betreffende buisjes.

6. Voeg aan alle buisjes (met uitzondering van de buisjes voor de "totaaltelling" en de NSB-buisjes) 50 µl TSH-RECEPTOR-oplossing toe. Meng alle buisjes met een "vortexmenger".

7. Incubeer gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur (op een ronschudapparaat, ingesteld op 150 toeren per minuut).

8. Voeg aan elk buisje 100 µl ¹²⁵I- bTSH-tracer toe en meng alle buisjes met een "vortexmenger".

9. Incubeer gedurende 2 uur bij kamertemperatuur (op een ronschudapparaat, ingesteld op 150 toeren per minuut).

10. Schud de PEG-oplossing met een magnetische roerder en voeg aan elk buisje (met uitzondering van de buisjes voor "totaaltelling") 2 ml koude PEG-oplossing (4 °C) toe.

BELANGRIJK:

SCHUD ELK BUISJE GRONDIG MET EEN "VORTEXMENER".

11. Centrifugeer alle buisjes (met uitzondering van de buisjes voor "totaaltelling") gedurende 30 minuten in een gekoelde centrifuge bij ongeveer 2.500 x g.

12. Zuig zorgvuldig het supernatans op.

13. Tel gedurende 1 minuut de radioactiviteit van alle buisjes.

SCHEMA VAN DE ASSAY

Buisjes	Totale activiteit	NSB	KAL0	KAL	Controles	Monsters
Reagens						
NSB	-	50 µl	-	-	-	-
Kalibrator 0	-	50 µl	50 µl	-	-	-
Kalibratoren*	-	-	-	50 µl	-	-
Controles	-	-	-	-	50 µl	-
Monsters	-	-	-	-	-	50 µl
TSH-receptor	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
- Meng voorzichtig en incubeer: gedurende 10 min. bij kamertemperatuur in een ronschudapparaat (150 toeren per minuut).						
Tracer	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
- Incubeer: gedurende 2 uur bij kamertemperatuur in een ronschudapparaat (150 toeren per minuut).						
PEG	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
- Centrifugeer: gedurende 30 min. (4 °C) bij 2.500 g.						
- Zuig het supernatans op.						
- Tel gedurende één minuut de radioactiviteit van de buisjes in een gammateller.						

* uitsluitend voor de methode met kalibratoren.

8. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- validatie van de assay

- Bepaal de gemiddelde telsnelheid (cpm) voor elke set buisjes.
- Bepaal het percentage van de **NIET-SPECIFIEKE BINDING** (NSB) als volgt:

$$\frac{NSB}{T} (\%) = \frac{NIET-SPECIFIEKE BINDING \text{ gemiddelde telsnelheid}}{TOTAAL \text{ gemiddelde telsnelheid}} \times 100$$

- Bepaal de in de test gebruikte **MAXIMALE BINDINGSSNELHEID** als volgt:

$$\frac{B_0 - NSB}{T} (\%) = \frac{KALIBRATOR 0 \text{ gemiddelde telsnelheid} - NSB \text{ gemiddelde telsnelheid}}{TOTAAL \text{ gemiddelde telsnelheid}} \times 100$$

- met kalibratoren

Bereken voor elke tweede bepaling eerst de gemiddelde NSB-gecorrigeerde tellingen:

Netto tellingen van de buisjes = Gemiddelde tellingen van de buisjes min Gemiddelde NSB-tellingen

Bereken voor elke tweede bepaling het bindingspercentage van gelabeld TSH aan de TSH-receptoren bij een negatief controleserum (B_0):

$$\text{Bindingspercentage} = \frac{\text{Netto tellingen}}{\text{Netto } B_0\text{-tellingen}} \times 100$$

Zet voor elke kalibrator het bindingspercentage op de Y-as uit tegenover de concentratie op de X-as op dubbellogaritmisch papier. Teken een rechte lijn door de kalibratiepunten. Vervolgens wordt de concentratie van de onbekenden geschat door te interpoleren op basis van de lijn.

In geval van computerondersteunende analyse moet een speciaal programma worden gebruikt, dat geschikt is voor radio-immunoassays en aangepast voor het teller-computer-systeem.

VOORBEELD VOOR BEREKENING MET KALIBRATOREN

De hieronder vermelde waarden moeten als voorbeeld worden beschouwd en mogen niet als experimentele gegevens worden gebruikt.

Beschrijving	Gemiddelde cpm	B/B ₀ (%)	TRAB-conc. (E/l)
Totale activiteit (T)	20230	-	-
NSB	832	-	-
CAL 0	8941	100	0
CAL 1	8229	91,2	5
CAL 2	6011	63,9	15
CAL 3	3999	39,1	45
CAL 4	2441	19,8	135
CAL 5	1725	11,0	405
CONTROL 1	6005	63,8	15,9
CONTROL 2	4231	41,9	44,3
P1	7836	86,4	5,7
P2	3679	35,1	53,7
P3	2675	22,7	109,5

- zonder kalibratoren

De referentiepunten voor de assay worden bepaald met behulp van de geleverde kalibrator 0. Onttrek eerst uit alle buisjes de controlereceptoren (NSB) om een specifieke TSH-binding te verkrijgen. Specifieke binding = Telling van de buisjes min NSB. Bereken vervolgens de remming van TSH-binding als volgt:

$$\text{Remming (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Specifieke binding bij een testmonster}}{\text{Specifieke binding bij kalibrator 0}} \right) \times 100$$

VOORBEELD VOOR BEREKENING ZONDER KALIBRATOREN

De hieronder vermelde waarden moeten als voorbeeld worden beschouwd en mogen niet als experimentele gegevens worden gebruikt.

Beschrijving	Gemiddelde cpm	Rem. (%)
Totale activiteit (T)	20230	-
NSB	832	-
KAL 0	8941	-
CONTROLE 1	6005	36,2
CONTROLE 2	4231	58,1
P1	7836	13,6
P2	3879	64,9
P3	2675	77,3

9. REFERENTIEWAARDEN

Het verdient aanbeveling dat elk laboratorium zijn eigen referentie-interval bepaalt. De hieronder vermelde waarden dienen uitsluitend als richtlijn.

- met kalibratoren

Minder dan 9 E/l:	Negatief voor autoantilichamen voor TSH-R.
Tussen 9 – 14 E/l	Grensgeval
Meer dan 14 E/l:	Positief voor autoantilichamen voor TSH-R.

- zonder kalibratoren

Indien u zonder kalibratoren werkt, raadpleeg dan het met de kit meegeleverde kwaliteitscontroleblad voor de remmingswaarden ter beoordeling van de positieve resultaten.

10. EIGENSCHAPPEN VAN DE ASSAY

SPECIFICITEIT

Toevoeging aan de volgende concentratie van mogelijkerwijs interfererende stoffen veroorzaakte geen significant verschil in de kwantitatieve concentratie van de AUTOANTILICHAMEN VOOR DE TSH-RECEPTOREN.

Stof	Concentratie
FSH	≤23000mIU/ml
LH	≤1200mIU/ml
HCG	≤140ng/ml
Thyreoglobuline	≤10μg/ml
Prolactine	≤135ng/ml
TSH	≤890mIU/l
HGH	≤1000ng/ml
IgM*	≤4.39mg/ml
IgA*	≤4.23mg/ml
IgG*	≤36mg/ml

* totale concentratie (serumconcentratie + immunoglobulines toegevoegd)

GEVOELIGHEID

Analytische gevoeligheid

De gevoeligheid werd berekend op basis van de kalibratiecurve en werd uitgedrukt als de minimumdosis die een significant verschil laat zien ten opzichte van de nulkalibrator (gemiddelde waarde - 2 SD). Deze dosis bedraagt 0,8 E/l.

Functionele gevoeligheid

De functionele assaygevoeligheid is de laagste waarde die wordt gemeten met een precisie die een variatie van maximaal 20% tussen de tests toelaat. Voor de antilichamen voor TSH-R bedraagt deze waarde 5,0 E/l.

PRECISIE

De precisie werd beoordeeld aan de hand van de variabiliteit binnen een test en tussen tests bij verschillende analytconcentraties.

Binnen een test

Serum	Gemiddeld e	± (E/I)	SD	VC (%)	N
1	18,4	±	1,4	7,6	20
2	29,8	±	2,3	7,7	20
3	79,3	±	7,7	9,7	20

Tussen tests

Serum	Gemiddelde (E/I)	±	SD	VC (%)	N
1	17,3	±	1,7	9,8	9
2	52,5	±	2,7	5,1	9
3	93,4	±	8,6	9,2	9

NAUWKEURIGHEID

De nauwkeurigheid van de methode werd beoordeeld door een recovery- en een parallellistetest.

Recovery-test

Monsters, gemengd met een gelijke hoeveelheid van elke kalibrator, werden getest.

	GEMETEN (E/I)	VERWACHT (E/I)	RECOVERY(%)
M1	15	-	-
M1 + CAL 0	4	8	59,1
M1 + CAL 1	9	10	90,7
M1 + CAL 2	16	15	105,3
M1 + CAL 3	28	30	93,4
M1 + CAL 4	78	75	103,4
M1 + CAL 5	244	210	116,0
M2	76	-	-
M2 + CAL 0	45	38	117,5
M2 + CAL 1	53	41	129,3
M2 + CAL 2	52	46	114,5
M2 + CAL 3	73	61	119,5
M2 + CAL 4	135	106	127,3
M2 + CAL 5	283	241	117,7

Parallellistetest

Sera met een hoge analytconcentratie werden bij verschillende verdunningen met de nulkalibrator getest.

VERDUNNING	GEMETEN (E/I)	VERWACHT (E/I)	RECOVERY (%)
M1 onverdund	210	-	-
1/2	123	108	113,9
1/4	63	54	116,7
1/8	27	27	100,0
M2 onverdund	139	-	-
1/2	71	69,5	102,2
1/4	37	34,7	106,6
1/8	16	17,4	92,0

Deze bijsluiter kan op www.zentech.be worden gedownload.

POLSKI

TEST RADIORECEPTOROWY DO ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA AUTOGENNYCH PRZECIWCIAŁ PRZECIW WŁASNYM RECEPTOROM TSH W LUDZKIEJ SUROWICY KRWI

R-CT-50 – 50 oznaczeń / R-CT-100 - 100 oznaczeń

WYŁĄCZNIE DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO

1. ZASTOSOWANIE KLINICZNE

Nadczynność tarczycy w chorobie Gravesa spowodowana jest przez autogenne przeciwciała przeciw własnym receptorom tyreotropiny (TSH). Oznaczenie tych przeciwciał jest istotne w diagnostyce i postępowaniu chorobie Gravesa.

2. ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Test do oznaczania autogennych przeciwciał przeciw własnym receptorom TSH jest testem radioreceptorowym (RRA) wykrywającym przeciwciała utrudniające wiązanie hormonu pobudzającego tarczycę (TSH) z receptorem TSH. W teście receptor TSH jest inkubowany z surowicą krwi, a po czasie preinkubacji z TSH znakowanym ¹²⁵I (Znacznik). Przeciwciała autogenne i znacznik radioaktywny konkurują o miejsca wiązania na receptorze. Tym samym, im wyższe miano przeciwciał, tym mniej TSH znakowanego ¹²⁵I wiąże się do receptora. Po inkubacji kompleks receptor-znacznik jest strącany glikolem polietylenowym (PEG). Po odwirowaniu supernatant jest zlewany. Zliczana jest radioaktywność osadu. Poziom aktywności przeciwciał przeciw własnym receptorom TSH w próbce wyznaczany jest z krzywej kalibracyjnej i wyrażany w jednostkach na litr (U/L).

3. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE W ZESTAWIE

- Ilość odczynników wystarcza na 50 (100) oznaczeń.
- Zestaw i odczynniki przechowywać w temperaturze 2-8°C.
- Data ważności każdego odczynnika podana jest na etykiecie.

- 1. Znacznik radioaktywny :** 2 (4) fiołki zawierające 3,0 ml liofilizowanego oczyszczonego 125I-bTSH. Rozpuścić zawartość każdej fiołki w 3,0 ml wody destylowanej i lekko wstrząsnąć. Przygotować znacznik przynajmniej na 10 min przed rozpoczęciem testu. Nadmiar roztworu niezużytego w teście należy wylać. Poziom radioaktywności: 12,8 KBq na fiołkę. Środek konserwujący: NaN₃ (<0,1%).
- 2. Kalibratory: Kalibrator 0 :** 1 fiołka zawierająca 1 ml ludzkiej surowicy krwi. Środek konserwujący: NaN₃ (<0,1%). **Kalibratory 1-5:** 5 fiołek zawierających 0,5 ml bTSH ludzkiej surowicy krwi. Środek konserwujący: NaN₃ (<0,1%). Kalibratory zawierają 5 – 15 – 45 – 135 – 405 U/L. Kalibratory zostały zestandaryzowane w teście receptorowym przeciw próbie standardowej MRC LATS Standard B. 1 jednostka kalibracji jest równoważna około 1 jednostce próby standardowej MRC LATS.
- 3. Kontrola:** 2 fiołki zawierające 0,5 ml ludzkiej surowicy krwi. Środek konserwujący: NaN₃ (<0,1%). **Dokładną wartość należy uzyskać z karty charakterystyki kontroli jakości.**
- 4. Receptor TSH:** 2 (4) fiołki zawierające liofilizowane receptory TSH. Środek konserwujący: NaN₃ (<0,1%). Rozpuścić zawartość każdej fiołki w 1,5 ml zimnego buforu, lekko wstrząsnąć i pozostawić na 10 min do rozpuszczenia, aż zawartość przybierze postać równomiernej zawiesiny. Wstrząsnąć zawartość na vorteksie na najwyższej prędkości aby receptory dobrze się rozpuściły. Nie rozpuszczać zawartości fiołek które nie będą bezpośrednio potem zużyte w teście (receptory nie są stabilne). Nadmiar niezużytego roztworu w teście należy wylać.
- 5. NSB (Kontrola receptora):** 1 fiołka zawierająca 1 ml roztworu NSB. Środek konserwujący: NaN₃ (<0,1%).
- 6. Bufor:** 1 fiołka zawierająca 6,5 ml roztworu buforu do rozpuszczania receptora TSH. Środek konserwujący: NaN₃ (<0,1%). Do rozpuszczania receptora TSH zawsze używać zimnego roztworu buforu.

7. **PEG:** 1(2) fiolka(i) zawierająca(e) roztwór buforu zawierający 100 ml PEG. Środek konserwujący: NaN_3 (<0,1%).

4. MATERIAŁY KONIECZNE NIEDOSTARCZONE W ZESTAWIE.

- Probówki stożkowe (12 x 75 mm).
- Stojaki do probówek.
- Menzurka.
- Woda destylowana.
- Automatyczne mikropipety z jednorazowymi końcówkami.
- Wytrząsarka typu Vortex.
- Mieszadło.
- Myjka lub urządzenie do mycia probówek.
- Wirówka chłodzeniem (przynajmniej 2500 x g)
- Licznik scyntylacyjny gamma.

5. OSTRZEŻENIA

Aby otrzymywać powtarzalne wyniki, należy się stosować do następujących zasad:

- Nie mieszać odczynników z różnych partii.
- Nie używać odczynników po upływie terminu ważności.
- Używać dokładnie umytego szkła laboratoryjnego.
- Używać wody destylowanej przechowywanej w czystych pojemnikach.
- Unikać zakażenia próbek, w tym celu należy do każdej próbki i odczynnika używać jednorazowych końcówek.

W celu uniknięcia zakażenia własnego oraz środowiska, należy się stosować do następujących ostrzeżeń:

- Używać jednorazowych rękawiczek podczas pracy z materiałem potencjalnie zakaźnym oraz przy wykonywaniu testu.
- Nie pipetować odczynników ustami.
- Nie palić, nie jeść i nie stosować kosmetyków w trakcie wykonywania testu.
- Wszystkie materiały używane do przygotowania niniejszego testu dały negatywny wynik w testach na obecność HBsAg i przeciwciał anty-HIV oraz anty-HCV. Ponieważ żaden obecnie stosowany test nie może zagwarantować całkowitej nieobecności tych wirusów, wszystkie próbki i odczynniki używane w teście muszą być traktowane jako potencjalnie zakaźne, a zatem odpady po testach muszą być odeskane a ich utylizacja musi przebiegać zgodnie z ustalonymi procedurami bezpieczeństwa. Utylizowany materiał palny musi być spopieleny, a niepalny materiał należy wysterylizować w autoklawie przez co najmniej 1 godzinę w temperaturze 121°C. Płynne odpady należy zneutralizować podchlorynem sodu o końcowym stężeniu 3%. Podchloryn powinien działać przez przynajmniej 30 minut. Płynne odpady zawierające kwasy należy zneutralizować odpowiednimi ilościami zasad przed użyciem podchlorynu sodu.
- Unikać rozlewania albo tworzenia aerozoli. W przypadku wylania splukać dokładnie 3% roztworem podchlorynu sodu i utylizować całość jako odpad potencjalnie zakaźny. Niektóre odczynniki zawierają azyd sodu jako środek konserwujący, w celu zapobieżenia gromadzeniu się wybuchowych azydów w przewodach kanalizacyjnych zawierających ołów i miedź. Odczynniki te należy przy wylewaniu splukać dużą ilością wody.
- Nabywanie, przechowywanie, używanie i utylizacja materiałów radioaktywnych (ciekłych i stałych) podlega właściwym przepisom i zaleceniom miejscowych władz.

6. POBIERANIE PRÓBEK

Próbki surowicy krwi do analizy muszą być poddane testowi zaraz po pobraniu albo przechowywane w roztworze w temperaturze -20°C. Należy unikać zamrażania i rozmrażania. Niewłaściwe przechowywanie próbek może prowadzić do utraty aktywności przeciwciał przeciw receptorom TSH. Nie używać próbek o silnej hemolizie lub lipemii. Nie używać do testów osocza. W odpowiednim czasie rozmrozić próbki w temperaturze pokojowej i delikatnie przemieszać przez odwrócenie probówki, aby zapewnić jednorodność próbki.

Wirować próbki przed testem (najlepiej przy 1,000-1,500 g w mikrowirówce), aby usunąć zawieszone cząstki.

7. PROCEDURY TESTU Z KALIBRATORAMI LUB BEZ KALIBRATORÓW

1. Zaleca się stosowanie stożkowych probówek polistyrenowych. Oznaczyć probówki jako Zliczenia całkowite (T), Wiązanie niespecyficzne (NSB), Kalibrator 0 (Bo), Kalibratory, Kontroli i Próby badane (podwójnie).

2. **NSB:** pobrać pipetą 50 µl roztworu NSB do odpowiednich probówek + 50 µl Kalibratora 0.

3. **CAL 0:** pobrać pipetą 50 µl kalibratora 0 do odpowiednich probówek.

4. **KRZYWA KALIBRACYJNA:** pobrać pipetą 50 µl każdego roztworu kalibratora do odpowiednich probówek (osobno).

W procedurze testu bez kalibratorów nie wykonywać kroku nr 4.

5. **PRÓBK I KONTROLI:** pobrać pipetą 50 µl każdej próbki kontrolnej albo próbki surowicy krwi pacjenta do odpowiednich probówek (osobno).

6. Dodać 50 µl roztworu RECEPTORA TSH do wszystkich probówek oprócz probówek T i NSB. Wymieszać wszystkie probówki na wortexie.

7. Inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej (na mieszadle przy 150 obrotów na minutę).

8. Dodać 100 µl znacznika ^{125}I - bTSH do każdej probówki i wymieszać wszystkie probówki na wortexie.

9. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 godziny (na mieszadle przy 150 obrotów na minutę).

10. Wstrząsnąć roztwór PEG na mieszadle magnetycznym i dodać 2 ml zimnego roztworu PEG (4°C) do wszystkich probówek oprócz probówek T.

WAŻNE:

KAZDĄ PRÓBWKĘ DOKŁADNIE WSTRZĄSAĆ NA VORTEKSIE.

Odwirować wszystkie probówki oprócz probówek T na wirówce z chłodzeniem przy ok. 2500 x g przez 30 minut.

12. Ostrożnie pobrać supernatant.

13. Zliczyć radioaktywność wszystkich probówek przez 1 minutę.

SCHEMAT TESTU

Probówki	Aktywność całkowita	NSB	CAL0	CAL	Kontrola	Próbki
Odczynnik						
NSB	-	50 µl	-	-	-	-
Kalibrator 0	-	50 µl	50 µl	-	-	-
Kalibratory*	-	-	-	50 µl	-	-
Kontrola	-	-	-	-	50 µl	-
Próbki	-	-	-	-	-	50 µl
Receptor	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TSH	-	-	-	-	-	-
- Zamieszać delikatnie i inkubować przez 10 min. w temp. pokojowej. Wytrząsnąć (150 obrotów na minutę).						
Znacznik	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
- Inkubować : 2 h. temp. pok. Wytrząsnąć (150 obrotów na minutę).						
PEG	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
- Wirować : 30 min. (4°C) przy 2500 g						
- Pobrać supernatant.						
- Zliczyć radioaktywność probówek przez minutę w liczniku gamma .						

* tylko przy metodzie z użyciem kalibratorów.

8. OBLICZENIE WYNIKÓW

- wartościowanie testu

- Oznaczyć przeciętną liczbę zliczeń (c.p.m.) dla każdego zestawu podwójnych probówek.

- Określić procent **WIĄZANIA NIESPECYFICZNEGO** (NSB) w sposób opisany poniżej:

$$\frac{\text{NSB}}{\text{T}} (\%) = \frac{\text{przeciętna liczba zliczeń wiązania niespecyficznego}}{\text{całkowita przeciętna liczba zliczeń}} \times 100$$

- Określić **LICZBĘ MAKSYMALNEGO WIĄZANIA** używaną w teście jak poniżej:

$$\frac{B_0 - \text{NSB}}{T} (\%) = \frac{\text{przeciętna liczba zliczeń CAL 0} - \text{przeciętna liczba zliczeń NSB}}{\text{całkowita przeciętna liczba zliczeń}} \times 100$$

- z kalibratorami

Najpierw obliczyć dla każdej podwojonej próbki przeciętną liczbę zliczeń skorygowaną o NSB :

Liczba zliczeń netto = Średnia liczba zliczeń minus średnia liczba zliczeń dla NSB

Obliczyć wartość wiązania dla każdej podwojonej próbki jako procent wiązania znakowanego TSH do receptorów TSH w obecności negatywnej surowicy kontrolnej (B_0) :

$$\text{Procent wiązania} = \frac{\text{Zliczenia netto}}{\text{Zliczenia netto dla } B_0} \times 100$$

Przy użyciu papieru Logit-Log paper, wykreślić procent wiązania na osi Y wobec stężenia na osi X dla każdego kalibratora. Narysować linię prostą przechodzącą przez punkty kalibracyjne. Stężenia nieznane określa się poprzez interpolację. Jeśli wykonuje się analizę przy pomocy komputera, należy używać odpowiedniego programu do testów radioimmunologicznych działającego dla systemu komputera i licznika.

PRZYKŁAD OBLICZEŃ Z KALIBRATORAMI

Wartości podane poniżej należy traktować jako przykładowe i nie należy ich podstawiać zamiast danych eksperymentalnych.

Opis	Średnia ilość zliczeń	B/B ₀ (%)	Stęż. TRAB (U/l)
Aktywność całkowita (T)	20230	-	-
NSB	832	-	-
CAL 0	8941	100	0
CAL 1	8229	91,2	5
CAL 2	6011	63,9	15
CAL 3	3999	39,1	45
CAL 4	2441	19,8	135
CAL 5	1725	11,0	405
Kontrola 1	6005	63,8	15,9
Kontrola 2	4231	41,9	44,3
P1	7836	86,4	5,7
P2	3679	35,1	53,7
P3	2675	22,7	109,5

- bez kalibratorów

Punkty referencyjne do testu określa się przy użyciu dostarczonego kalibratora 0. Najpierw należy odjąć wartość dla receptorów kontrolnych (NSB) od wartości dla każdej próbki aby otrzymać związane specyficznie TSH. Związane specyficznie = zliczenia dla próbki minus NSB
Następnie wyliczyć inhibicję wiązania TSH jak poniżej :

$$\text{Inhibicja (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Związane specyficznie w obecności próbki}}{\text{Związane specyficznie w obecności kalibratora 0}} \right) \times 100$$

PRZYKŁAD OBLICZENIA BEZ KALIBRATORÓW

Wartości podane poniżej należy traktować jako przykładowe i nie należy ich podstawiać zamiast danych eksperymentalnych.

Opis	Średnia ilość zliczeń	Inhibicja (%)
Aktywność całkowita (T)	20230	-
NSB	832	-
CAL 0	8941	-
Kontrola 1	6005	36,2
Kontrola 2	4231	58,1
P1	7836	13,6
P2	3879	64,9
P3	2675	77,3

9. WARTOŚCI REFERENCYJNE

Zaleca się aby każde laboratorium określiło własny przedział referencyjny. Wartości podane poniżej są wyłącznie orientacyjne.

- z kalibratorami

Poniżej 9 U/l:	Negatywny dla przeciwciał autogennych przeciw TSH-R.
Pomiędzy 9–14 U/l	Linia graniczna
Powyżej 14 U/l:	Pozytywny dla przeciwciał autogennych przeciw TSH-R.

- bez kalibratorów

W przypadku pracy bez kalibratorów, wartości inhibicji potrzebne do stwierdzenia pozytywnego wyniku należy odczytać z dostarczonej w zestawie karty charakterystyki kontroli jakości.

10. CHARAKTERYSTYKA TESTU

SWOISTOŚĆ

Dodanie substancji dających możliwą interferencję w poniższych stężeniach nie spowodowało istotnej różnicy w oznaczeniu ilościowym poziomu przeciwciał przeciw receptorowi TSH.

Substancja	Stężenie
FSH	≤23000mIU/ml
LH	≤1200mIU/ml
HCG	≤140ng/ml
Tyreoglobulina	≤10μg/ml
Prolaktyna	≤135ng/ml
TSH	≤890mIU/l
HGH	≤1000ng/ml
IgM*	≤4,39mg/ml
IgA*	≤4,23mg/ml
IgG*	≤36mg/ml

* stężenie całkowite (stężenie surowicy + dodana immunoglobulina)

CZUŁOŚĆ

Czułość analityczna

Czułość obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej i wyrażono w postaci minimalnej dawki dającej istotną różnicę od kalibratora zero (wartość średnia - 2 S.D.). Dawka ta wynosi 0,8 U/l.

Czułość funkcjonalna

Czułość funkcjonalna testu to najniższy poziom który jest mierzony z 20% precyzją zmienności wewnątrztestowej. Dla przeciwciał przeciw TSH-R wartość ta wynosi 5,0 U/l.

PRECYZJA

Precyzja została wyznaczona ze zmienności wewnątrz- i zmienności międzytestowej przy różnych stężeniach analizowanej substancji.

Wewnątrztestowa

Surowica	Średnia	± (U/l)	S.D.	C.V. (%)	N
1	18,4	±	1,4	7,6	20
2	29,8	±	2,3	7,7	20
3	79,3	±	7,7	9,7	20

Międzytestowa

Surowica	Średnia	± (U/l)	S.D.	C.V. (%)	N
1	17,3	±	1,7	9,8	9
2	52,5	±	2,7	5,1	9
3	93,4	±	8,6	9,2	9

DOKŁADNOŚĆ

Dokładność metody została sprawdzona przy pomocy testu odzyskania i równoległości.

Test Odzyskania: Testowano próbki zmieszane z równymi objętościami każdego punktu kalibracyjnego.

	MIERZONA (U/l)	OCZEKIWANA (U/l)	ODZYSKANIA (%)
S1	15	-	-
S1 + CAL 0	4	8	59,1
S1 + CAL 1	9	10	90,7
S1 + CAL 2	16	15	105,3
S1 + CAL 3	28	30	93,4
S1 + CAL 4	78	75	103,4
S1 + CAL 5	244	210	116,0
S2	76	-	-
S2 + CAL 0	45	38	117,5
S2 + CAL 1	53	41	129,3
S2 + CAL 2	52	46	114,5
S2 + CAL 3	73	61	119,5
S2 + CAL 4	135	106	127,3
S2 + CAL 5	283	241	117,7

Test równoległości: Testowano próbki o wysokim stężeniu substancji analizowanej przy różnych rozcieńczeniach kalibratorem zero.

ROZCIEŃCZENIE	MIERZONA (U/l)	OCZEKIWANA (U/l)	ODZYSKANIA (%)
S1 nierozcieńczona	210	-	-
1/2	123	108	113,9
1/4	63	54	116,7
1/8	27	27	100,0
S2 nierozcieńczona	139	-	-
1/2	71	69,5	102,2
1/4	37	34,7	106,6
1/8	16	17,4	92,0

Niniejszą instrukcję można pobrać ze strony www.zentech.be

PORTUGES

ENSAIO RADIORECEPTOR PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE AUTOANTICORPOS ANTI-RECEPTOR DE TSH EM SORO HUMANO.

R-CT-50 – 50 Determinações /R-CT-100 - 100 Determinações

SOMENTE PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

1. APLICAÇÕES CLÍNICAS

O hipertireoidismo na doença de Graves é devido aos autoanticorpos direcionados contra os receptores de tirotropin (TSH) e a medida destes autoanticorpos é valiosa no diagnóstico e no monitoramento da doença de Graves.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O ensaio dos autoanticorpos receptor de TSH é um ensaio radioreceptor (RRA) que detecta autoanticorpos que interferem na ligação do hormônio estimulante da tireoide (TSH) com o receptor de TSH. No ensaio, o receptor de TSH é incubado com soro e após um período de pre-incubação com o TSH marcado com ¹²⁵I. Os autoanticorpos e o marcador competem por sítios de ligação no receptor. Consequentemente, ocorre um aumento no título de autoanticorpos e diminuição de TSH marcado com ¹²⁵I. Seguindo a incubação o complexo receptor-marcador é precipitado com polietileno glicol (PEG). Após centrifugação, o sobrenadante é removido e o precipitado é contado. As unidades da atividade dos autoanticorpos receptor de TSH na amostra são determinadas na curva de calibração e expressadas como unidades/L (U/L).

3. MATERIAL FORNECIDO

- Os reagentes são suficientes para 50 (100) determinações.
- Armazene o kit e os reagentes entre 2-8°C.
- A data de validade de cada reagente é mostrada na etiqueta.

- Marcador Radioativo:** 2 (4) frascos contendo 3.0 ml deTSH purificado marcado com ¹²⁵I (liofilizado). Reconstituir cada frasco com 3.0 ml de água destilada e misturar gentilmente. Reconstituir o marcador pelo menos 10 minutos antes do começo do teste. Toda solução adicional não usada no teste deve ser descartada. Índice de radioatividade: 12,8 KBq por frasco. Preservativo: Na₃ (< 0,1%).
- Calibradores:**
Calibrador 0: 1 frasco contendo 1 ml de soro humano. Preservativo: Na₃ (< 0,1%).
Calibradores 1-5: 5 frascos contendo 0,5 ml de TSH em soro humano. Preservativo: Na₃ (< 0,1%). Os calibradores contêm 5- 15- 45- 135- 405 U/l. Calibradores foram padronizados no ensaio contra padrão B MRC LATS. Uma unidade de calibração é aproximadamente equivalente a 1 unidade de padrão B MRC LATS.
- Controles:** 2 frascos contendo 0,5 ml de soro. Preservativo: Na₃ (< 0,1%). **Para o valor exato, consulte ao valor escrito na folha de dados do controle da qualidade.**
- Receptor de TSH:** 2 (4) frascos contendo receptores liofilizados de TSH. Preservativo: Na₃ (< 0,1%). Reconstituir cada frasco com 1,5 ml do tampão frio, misture-o gentilmente para dissolver-SE POR 10 minutos até que o conteúdo esteja suspenso uniformemente. Misture o conteúdo no vortex na velocidade máxima para assegurar a dissolução dos receptores. Não reconstitua os frascos que não serão usados imediatamente no ensaio. Os receptores reconstituídos de TSH não são muito estáveis. Toda a solução em excesso não usada no teste deve ser descartada.
- NSB (receptor controle):** 1 frasco contendo 1 ml da solução de NSB. Preservativo: Na₃ (< 0,1%).
- Tampão:** 1 frasco contendo 6,5 ml da solução tamponada para a reconstituição de receptores de TSH. Preservativo: Na₃ (< 0,1%). Use sempre uma solução fria para a reconstituição de receptores de TSH.
- PEG:** 1(2) frascos da solução tamponada contendo 100 ml de PEG. Preservativo: Na₃ (< 0,1%).

4. MATERIAL REQUERIDO MAS NÃO FORNECIDO

- Tubos de teste cônicos (12X75 mm)
- estantes para tubos
- micropipetas ajustáveis, automáticas com ponteiros descartáveis.
- vortex.
- cilindro graduado.
- bomba de aspiração ou dispositivo de lavagem automatizado.
- cintilador
- água destilada.
- Agitador orbital ajustável para 150 rpm
- Centrífuga refrigerada (min 2500 x g)

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

A fim de obter resultados reproduzíveis, as seguintes regras devem ser observadas:

- não misture reagentes de lotes diferentes.
- não use reagentes depois de expirado o prazo de validade
- utilize vidraria completamente limpa.
- Utilize água destilada, armazenada em recipientes limpos.
- Evite qualquer contaminação entre amostras; para isto, ponteiros descartáveis devem ser usadas para cada amostra e reagente.

A fim evitar contaminação pessoal e ambiental, as seguintes precauções devem ser observadas:

- use luvas descartáveis ao manusear material potencialmente infectado e ao executar o ensaio.
- não pipete reagentes com a boca.
- não fume, não coma, não beba e não aplique cosmético durante o ensaio
- Todos os materiais de origem humana usados para a preparação deste kit foram negativos para HBsAg, anti-Anti-HIV e anti-HCV. Até o presente momento não existe nenhum teste que possa garantir a ausência completa destes vírus, portanto, todas as amostras e reagentes usados no ensaio devem ser considerados potencial infectados; conseqüentemente, os resíduos do ensaio devem ser descontaminados e descartados, de acordo com procedimentos de segurança estabelecidos. O material inflamável descartável deve ser incinerado; o material não inflamável descartável deve ser esterilizado em autoclave por pelo menos 1 hora a 121°C.
- os descartes líquidos devem ser colocados em solução de hipoclorito de sódio com uma concentração final de 3% . Deixar o hipoclorito agir por pelo menos 30 minutos. Os descartes líquidos que contêm ácidos devem ser neutralizados com quantidades apropriadas de base antes do tratamento com o hipoclorito de sódio.
- evite espirros e formação de aerossóis; em caso de derramamento, lave cuidadosamente com solução de hipoclorito de sódio a 3% e descarte este líquido como resíduo potencialmente contaminado.
- alguns reagentes contêm azida sódica como o preservativo; para prevenir a deposição de metais azidas explosivos nos encanamentos de chumbo e cobre, os reagentes devem ser descartados utilizando-se grandes quantidades de água.
- a aquisição, o armazenamento, o uso e a eliminação do material radioativo (líquido e sólido) estão sujeitos aos regulamentos e ordens das autoridades locais.

6. COLETA DA AMOSTRA

Os soros a serem analisados devem ser testados logo após a separação ou estocado em aliquotas e conservados a -20°C. O congelamento e descongelamento devem ser evitado. O armazenamento incorreto das amostras pode levar à perda da atividade dos autoanticorpos receptores de TSH. Não use amostras hemolizadas ou lipêmicas. Não use plasma no ensaio. Quando necessário, descongelar as amostras em temperatura ambiente e misture-as gentilmente por inversão para assegurar homogeneidade. **Centrifuge as amostras antes do ensaio (preferivelmente entre 1.000-1.500 g) para remover toda a matéria.**

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. O uso do tubo cônico do poliestireno é recomendado. Etiquete os tubos para as contagens totais (t), Ligação não específica (NSB), calibrador 0 (Bo), calibradores, controles, e amostras em duplicata.
 2. **NSB:** pipete **50µl** da solução de NSB nos tubos correspondentes + 50µl do calibrador 0.
 3. **Cal 0:** Pipete **50µl** do calibrador 0 nos tubos correspondentes.
 4. **CURVA DE CALIBRAÇÃO:** pipete 50µl de cada solução do calibrador em seus tubos respectivos. **No procedimento do ensaio sem calibradores não execute esta etapa 4.**
 5. **AMOSTRAS E CONTROLES:** introduza com pipeta 50µl do controle ou dos soros dos pacientes em seus tubos respectivos.
 6. Adicione **50µl** da solução do RECEPTOR de TSH a todos os tubos exceto aos tubos para contagem total e tubos de NSB. Misture todos os tubos no vortex
 7. Incube por 10 minutos em temperatura ambiente (no agitador orbital em 150 rpm)
 8. Adicione **100 µl** de marcador bTSH ¹²⁵I a cada tubo e misture todos os tubos no vortex.
 9. Incube em temperatura ambiente por 2 horas (no agitador orbital em 150 rpm).
 10. Agite a solução de PEG sob agitação magnética e adicione 2 ml da solução fria de PEG (4°C) a cada tubo exceto da contagem total.
- IMPORTANTE:**
AGITE CADA TUBO VIGOROSAMENTE USANDO O VORTEX.
11. Centrifuge todos os tubos, exceto da contagem Total, em uma centrífuga refrigerada aproximadamente 2.500 x g por 30 minutos.
 12. Aspire o sobrenadante com cuidado.
 13. Conte o radioatividade de todos os tubos por 1 minuto.

ESQUEMA DO ENSAIO

Tubos	Ativid-ade Total	NSB	CAL0	CAL1	Contro-les	Amos-tras
Reagente						
NSB	-	50 µl	-	-	-	-
Calibrador 0	-	50 µl	50 µl	-	-	-
Calibradores	-	-	-	50 µl	-	-
Controles	-	-	-	-	50 µl	-
Amostras	-	-	-	-	-	50 µl
TSH Receptor	-	-	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
- Misturar gentilmente e incubar: 10 min. T.A. sob agitação (150 rpm)						
Marcador	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
- Incubar : 2 h. .TA sob agitação (150 rpm)						
PEG	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
- Centrifuge : 30 min. (4°C) a 2,500 g - Aspire o sobrenadante. - Conte a radioatividade dos tubos por 1 min em um contador gama.						

* somente para o método com calibradores.

8. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Validação do Ensaio

- Determinar a contagem média (c.p.m.) para cada jogo de tubos em duplicata
- Avaliar a porcentagem de Ligação não Específica (NSB) como segue:

$$\frac{\text{NSB}}{\text{T}} (\%) = \frac{\text{Média da contagem de ligações não específicas}}{\text{Média da contagem total}} \times 100$$

- Avaliar o GRAU MÁXIMO DE LIGAÇÃO usado no teste como se segue:

$$\frac{\text{Bo} - \text{NSB}}{\text{T}} (\%) = \frac{\text{Média da contagem do cal. 0} - \text{Média da contagem de NSB}}{\text{Média da contagem Total}} \times 100$$

com calibradores

- Primeiramente, calcule para cada duplicata as médias das contagens NSB corrigidas:
- Contagem líquida dos tubos = as contagens médias do tubo menos as contagens médias de NSB
- Calcule a ligação de cada duplicata como a porcentagem de ligação de TSH marcado com os receptores de TSH na presença do soro controle negativo (B0):

Porcentagem de Ligação = $\frac{\text{Contagem líquida}}{\text{Contagem B}_0 \text{ líquida}} \times 100$

Usando papel de registro Logit-Log, coloque o percentual de Ligação no eixo Y contra a concentração de cada calibrador no eixo x. Desenhe uma linha reta através dos pontos de calibração. As concentrações desconhecidas são estimadas pela interpolação. No caso de uma análise por computador, um programa especial apropriado para radioimunoensaio é adaptado ao contador computadorizado que deve ser usado.

EXEMPLO DE CÁLCULO COM CALIBRADORES

Os valores relatados abaixo devem ser considerados como um exemplo e não podem ser usados no lugar dos dados experimentais

Descrição	Média cpm.	B/B0 (%)	TRAB conc. (U/I)
Atividade Toatal (T)	20230	-	-
NSB	832	-	-
CAL 0	8941	100	0
CAL 1	8229	91,2	5
CAL 2	6011	63,9	15
CAL 3	3999	39,1	45
CAL 4	2441	19,8	135
CAL 5	1725	11,0	405
CONTROL 1	6005	63,8	15,9
CONTROL 2	4231	41,9	44,3
P1	7836	86,4	5,7
P2	3679	35,1	53,7
P3	2675	22,7	109,5

sem calibradores

- Os pontos de referência para o ensaiosão determinados usando o calibrador 0 fornecido. Subtraia primeiramente os receptores controle (NSB) de cada tubo para obter a ligação específica de TSH. Ligação específica = contagem do tubo menos NSB então, calcular a inibição da ligação de TSH como segue:

Inibição (%) = $\frac{(1 - \frac{\text{Ligação específica na presença da amostra teste}}{\text{Ligação específica na presença do calibrador 0}}) \times 100$

EXEMPLO DO CÁLCULO SEM CALIBRADORES

Os valores relatados abaixo devem ser considerados como um exemplo e não podem ser usados no lugar dos dados experimentais

Descrição	Média cpm.	Inib (%)
Atividade Total (T)	20230	-
NSB	832	-
CAL 0	8941	-
CONTROLE 1	6005	36,2
CONTROLE 2	4231	58,1
P1	7836	13,6
P2	3879	64,9
P3	2675	77,3

9. VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório determine seu próprio intervalo de referência. Valores relatados abaixo são apenas indicativos.

Com calibradores

Menor que 9 U/I:	Negativo para autoanticorpos TSH-R
Entre 9–14 U/I	Limite
Maior que 14 U/I:	Positivo para autoanticorpos TSH-R.

Sem calibradores

Para estimar resultados positivos, ao trabalhar sem os calibradores, consulte por favor a folha do controle de qualidade incluída no kit.

10. DESEMPENHO DO ENSAIO

ESPECIFICIDADE

A adição dos seguintes níveis de possíveis substâncias que interferem não causou nenhuma diferença significativa em níveis quantitativos dos autoanticorpos receptor de TSH .

Substâncias	Concentrações
FSH	≤23000mIU/ml
LH	≤1200mIU/ml
HCG	≤140ng/ml
Tiroglobulina	≤10µg/ml
Prolactina	≤135ng/ml
TSH	≤890mIU/l
HGH	≤1000ng/ml
IgM*	≤4.39mg/ml
IgA*	≤4.23mg/ml
IgG*	≤36mg/ml

* concentração total (soro concentrado + imunoglobulinas adicionadas)

SENSIBILIDADE

A sensibilidade analítica

A sensibilidade foi calculada baseada na curva de calibração e expressada como a dose mínima que mostra uma diferença significativa do calibrador zero (valor médio - 2 S.D.). Esta dose é de 0,8 U/L

Sensibilidade Funcional

O ensaio de sensibilidade funcional é o valor mais baixo que é medido com uma precisão da variação dentro do ensaio de no máximo 20%. Para o TSH-R, este valor é menor que 5.0 U/I

PRECISÃO

A precisão foi avaliada em cima da variabilidade no ensaio e entre ensaios, em diferentes concentrações.

No ensaio

Soro	Média	± (U/I)	S.D.	C.V. (%)	N
1	18,4	±	1,4	7,6	20
2	29,8	±	2,3	7,7	20
3	79,3	±	7,7	9,7	20

Entre Ensaios

Soro	Média	± (U/I)	S.D.	C.V. (%)	N
1	17,3	±	1,7	9,8	9
2	52,5	±	2,7	5,1	9
3	93,4	±	8,6	9,2	9

ACURÁCIA

A exatidão do método foi avaliada por testes de recuperação e de paralelismo.

Teste de Recuperação

As amostras do teste de recuperação, misturadas com volumes iguais de cada calibrador foram testadas

	Esperado (U/L)	Mensurado (U/L)	Recuperação (%)
A1	15	-	-
A1 + CAL 0	4	8	59,1
A1 + CAL 1	9	10	90,7
A1 + CAL 2	16	15	105,3
A1 + CAL 3	28	30	93,4
A1 + CAL 4	78	75	103,4
A1 + CAL 5	244	210	116,0
A2	76	-	-
A2 + CAL 0	45	38	117,5
A2 + CAL 1	53	41	129,3
A2 + CAL 2	52	46	114,5
A2 + CAL 3	73	61	119,5
A2 + CAL 4	135	106	127,3
A2 + CAL 5	283	241	117,7

Teste Paralelismo

Soros com alta concentração foram testados em diferentes diluições com o calibrador Zero

Diluição	Esperado (U/L)	Mensurado (U/L)	Recuperação (%)
A1 sem diluir	210	-	-
1/2	123	108	113,9
1/4	63	54	116,7
1/8	27	27	100,0
A2 sem diluir	139	-	-
1/2	71	69,5	102,2
1/4	37	34,7	106,6
1/8	16	17,4	92,0

Esta bula está disponível para download no site www.zentech.be

11. BIBLIOGRAPHIE – BIBLIOGRAPHY – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ – BIBLIOGRAFIE – BIBLIOGRAFIA - BIBLIOGRAFIA - BIBLIOGRAFÍA

1. Akamizu T., Mori T., Imura H., Noh J., Hamada N., Ito K., Koizumi Y., Yamada T., Fujihira T., Eto S., Hara Y., Ishii J., Kajita Y., Shinozawa T., Ichikawa Y., Kaise K. and Sakurada T. Clinical significance of anti-TSH antibody in sera from patients with Graves' disease and other thyroid disorders. J. Endocrinol. Invest., 1989, 12, 483-488.
2. Cho B.Y., Shong, M.H., Yi K.H., Lee H.K., Koh Ch-S and Min H.K. Clin. Evaluation of serum basal thyrotrophin levels and thyrotrophin receptor antibody activities as prognostic markers for discontinuation of antithyroid drug treatment in patients with Graves'disease. Clin. Endocrinology, 1992, 36, 585-590.
3. Gupta M.K. Thyrotropin receptor antibodies : advances and importance of detection techniques in thyroid diseases. Clin. Biochem., 1992, 25, 193-199.
4. Harrison L.C. and Leedman P.J. The thyroid stimulating hormone receptor in human disease. Clin. Biochem., 1990, 23, 43-48.
5. Kasagi K., Hidaka A., Endo K., Miyamoto S., Takeuchi R., Misaki T., Sakahara H. and Konishi J. Fluctuating thyroid function depending on the balance between stimulating and blocking types of TSH receptor antibodies: a case report. Thyroid, 1993, 3, (4), 315-318.
6. Kasagi K., Hidaka A., Nakamura H., Takeuchi R., Misaki T., Iida Y., and Konishi J. Thyrotropin receptor antibodies in hypothyroid Graves' disease. J. of Endocrinol. and Metab., 1993, 76 (2), 504-508.
7. McKenzie J. M. and Zakarija M. The clinical use of thyrotropin receptor antibody measurements. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1989, 69(6), 1093-1096.
8. Smith B. R., McLachlan S. M. and Furmaniak J. Autoantibodies to the thyrotropin receptor. Endocrine Reviews, 1988, 9 (1), 106-121.
9. Smith B. R., Pyle G.A., Petersen V.B. and Hall R. Interaction of thyroid-stimulating antibodies with the human thyrotrophin receptor. J. Endocr., 1977, 75, 401-407
10. Shewring G. and Smith B. R. An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. Clin. Endocrinol. Welsh National School of Medicine, Cardiff CF4 4XN, UK, 1982, 17, 409-417.
11. Wilson R., Fraser, W. D., McKillop J. H. and Thomson J.A. The prognostic value of TSH receptor binding and thyroid stimulating antibodies following antithyroid drug treatment of Grave's disease. Acta Endocrinol. (Copenh.), 1989, 121, 666-670.