

# THYBIA

DiaSorin

## Radio receptorová analýza (RRA) pro kvantitativní stanovení autoprotilátek proti TSH receptoru (TRAb) v lidském séru

REF 277-050  
Σ 50 stanovení

DiaSorin S.p.A.  
Via Crescentino snc  
13040 Saluggia (VC)  
Italy

Servis  
Tel.: +39-0161-487-093  
Fax: +39-0161-487-628

## Uživatelská příručka pro THYBIA

Datum: 19.02.2009

Tato verze nahrazuje všechny dřívější verze uživatelských příruček.

### Změny obsahu ve srovnání s předchozí verzí

- Nová verze



2-8°C

## Obsah soupravy

	CONT	REF	277-050		
		Σ	50 stanovení		
A	Ag		1 x 5,5 mL < 1 x 40 kBq		<b>Indikátor</b> , 125I-TSH (izolovaný z bovinních hypofýz), s radioaktivním jodem, červené barvy, připraveno k použití.
L	REAG REC RCNS 1.5 mL		2 x		<b>TSH receptor</b> (izolovaný z prasečí hypofýzy), lyofilizovaný, pro rekonstituci s 1,5 mL pufrém H v každé lahvičce.
H	BUF		1 x 10,5 mL		<b>Pufr</b> , pro rekonstituci činidla L, připraveno k použití.
P	REAG PREC		1 x 105 mL		<b>Precipitant</b> , připraveno k použití.
S0 – S5	CAL		6 x 0,5 mL		<b>TRAK standardy</b> (bTSH v lidském séru), připraveno k použití, koncentrace: 0; 5; 15; 45; 135; 405 U/L.
K1, K2	CONTROL		2 x 0,5 mL		<b>THYBIA kontroly K1 a K2</b> (lidské sérum), připraveno k použití, koncentrace viz příloženou příbalovou informaci pro kontrolu kvality.

## Úvod

THYBIA je testovací souprava pro kvantitativní stanovení autoprotilátek proti TSH receptoru (TRAK/TRAb) v lidském séru. THYBIA poskytuje vynikající výsledky vysokou senzibilitu a dobrou reprodukovatelností a svým jednoduchým použitím.

Přítomnost (auto-) protilátek proti TSH receptoru je příčinou imunogenní tyreotoxikózy (Graves-Basedowova choroba). Hlavní indikací pro stanovení TRAb je diferenciací mezi imunogenní tyreotoxikózou a diseminovanou autoimunní thyreoiditidou. V určitých případech se stanovení protilátek proti TSH receptoru provádí pro kontrolu léčby.

Detekce TRAb je založena na jejich schopnosti navázat se na TSH receptor, čímž se inhibuje navázání TSH (thyrotropní hormon).

V prvním kroku analýzy stanovení TRAb se vzorek se sérem inkubuje s TSH receptory. V přítomnosti TRAb se vazebná místa pro receptor obsadí protilátkami. Ve druhém kroku se radioaktivně značený TSH přidá do reakční směsi jako indikátor. Značený TSH se naváže na zbylé neobsazené TSH receptory.

## Důležité poznámky

Tato souprava obsahuje materiály lidského původu (např. lidské sérum). Tyto materiály byly testovány na přítomnost HBsAg, HIV I/II protilátek a HCV protilátek. Všechny testy byly negativní. Přesto je nutné s činidly a vzorky od pacientů zacházet opatrně, protože všechny materiály lidského původu jsou potenciálně nebezpečné.

Tento produkt obsahuje radionuklid jód-125 ve formě otevřené radioaktivní látky. Ionizující záření ve formě fotonového záření je emitováno energií přibližně 30 keV. Poločas rozpadu je 60 dní. Tento produkt je nutno uchovávat chráněný a zabezpečený proti ztrátě. Musí se likvidovat jako radioaktivní odpad.

Pro zajištění přiměřené ochrany před zářením se musí zamezit proniknutí radioaktivních látek do organismu. Pracovní místnosti se musí větrat. Je zakázáno jíst, pít a kouřit. Při práci je nutno používat zástěru a ochranné rukavice. Zamezte zbytečnému setrvávání v blízkosti zdrojů záření. Doporučuje se vypočítat osobní dávku použitím vhodných měřících zařízení, např. filmových dozimetřů.

## Standardizace a referenční rozsahy

Hodnoty TRAb < 9 U/L jsou považovány za TRAb negativní; TRAb koncentrace na této úrovni jsou považovány za TRAb pozitivní. Rozsah 9 a 14 U/L je často definován jako hraniční (šedá zóna).

Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila vlastní referenční rozsahy na reprezentativním vzorku pacientů a/nebo provedla test validity dat komerčně dostupné testovací soupravy výrobce. Toto umožní identifikaci regionálních vlastností a variací při prevalenci určitých nemocí štítné žlázy a dysfunkcí, a rovněž poslouží jako test metodologické kvality jednotlivých laboratoří a testovacích souprav. Údaje poskytnuté pro THYBIA by proto měly být považovány za orientační.

**Kontrola jakosti:** Musí se dodržet národní předpisy na zajištění jakosti pro kvantitativní testy ve zdravotnické laboratoři (současná verze). Například, správnost a přesnost testu lze monitorovat pomocí laboratorních kontrolních materiálů v rámci vlastního pracoviště a/nebo použitím komerčně dostupných kontrolních materiálů. Kontroly obsažené v soupravě musí například být použity pro každou dávku a výsledky musí ležet v přijatelném rozsahu, který je uvedený v příbalové informaci pro kontrolu kvality. Při získání neakceptovatelných kontrolních hodnot postupujte tak, jak je uvedeno ve standardních laboratorních diagnostických postupech pro určení příčiny, a implementujte nápravná opatření.

Pro separaci navázaných a volných značených TSH jsou TSH receptory precipitovány precipitátem a centrifugovány. Po dekantování supernatantu (obsahujícího volný značený TSH) se pelety (obsahující navázaný značený TSH) spočítají v detektoru záření gama.

Obsah TRAb ve vzorku pacienta je nepřímo úměrný navázanému značenému TSH.

Analýza je kalibrována s MRC standardem LATS-B 65/122 a TSAb standardem WHO 90/672.

Příjem, nabytí, držení, použití a přeprava radioaktivního materiálu podléhá specifickým normám každé země.

Následující činidla soupravy obsahují konzervační látku azid sodný v koncentracích < 0,1 hmotnostních procent: indikátor, precipitát, standardy a kontroly. Tato činidla se nesmí požívat a je třeba zabránit kontaktu s kůží nebo sliznicemi.

**TSH receptor** obsahuje Triton® X-100 a kyselinu etylendiamintetraoctovou (EDTA) (Xn zdraví škodlivý: R22 R41 S24 S26 S39). Zdraví škodlivý při požití. Nebezpečí vážného poškození očí. Zamezte styku s kůží. Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte osobní ochranné prostředky pro oči a obličej.

V případě, že souprava s činidly obsahuje skleněné lahvičky, výslovně zdůrazňujeme, že u nich existuje riziko rozbití a následného poranění.

Činidla je nutno likvidovat v souladu se specifikacemi místních orgánů.

Výsledky získané z této analýzy se musí vždy vyhodnotit v kombinaci s klinickým vyšetřením, anamnézou pacienta a ostatními nálezy ještě před provedením závažných opatření.

## Literatura

1. L. C. Harrison and P. J. Leedman: The Thyroid Stimulating Hormone Receptor in Human Disease. Clin. Biochemistry 23 (1990) 43-48
2. R. Wilson, W. D. Fraser, J. H. McKillop and J. A. Thomson: The prognostic value of TSH receptor binding and thyroid stimulating antibodies following antithyroid drug treatment of Graves' disease. Acta Endocrinologica 121 (1989) 666-670
3. J. M. McKenzie and M. Zakarija: Clinical Review 3. The clinical use of Thyrotropin Receptor Antibody measurements. J. Clin. Endocrinol. Metab. 69 (1989) 1093-1096
4. B. Rees Smith and R. Hall: Measurement of Thyrotropin Receptor Autoantibodies. Methods Enzymol. 74 (1981) 405-420
5. V. Michelangeli, C. Poon, J. Taft, H. Newnham, D. Topliss and P. Colman. The prognostic value of thyrotropin receptor antibody measurement in the early stages of treatment of Graves' disease with antithyroid drugs. Thyroid 8 (1998) 119-124

## Postup testu

### Schéma inkubace

1. Očísľujte	zkumavky (a, b)		0	1-5	6 atd.
2. Napipetujte	nulový standard	$\mu\text{L}$	50	–	–
	standards	$\mu\text{L}$	–	50	–
	vzorky pacientů	$\mu\text{L}$	–	–	50
3. Napipetujte a zamíchejte	TSH receptor (práve rekonstituované)	$\mu\text{L}$	50	50	50
4. Inkubujte			<b>15 min při pokojové teplotě (17-27°C)</b>		
5. Napipetujte a zamíchejte	indikátor	$\mu\text{L}$	100	100	100
6. Inkubujte			<b>2 h při pokojové teplotě (17-27°C)</b>		
7. Napipetujte	precipitant (chlazený, 2-8°C)	mL	2	2	2
8. Centrifugujte (pokud možno chlazené)			nejméně 20 minut při 2000 x g nebo nejméně 10 min při 2500 x g		
9. Dekantujte (bez aspirace)			Dekantujte supernatant kompletně a obraťte zkumavky dnem vzhůru na sací papír na dobu 5-15 min		
10. Změřte radioaktivitu (doporučený čas odečtu: 1 min)					

Výpočet výsledků

### Manipulace se vzorky

Jako vzorek se musí použít pouze čisté lidské sérum (pokud sérum pacienta není čisté, provedte jeho centrifugaci). **Nepoužívejte lipemické a hemolytické vzorky ani plazmu.**

Pokud vzorky séra nelze ihned analyzovat, lze je uchovávat 3 dny při teplotě 2-8°C nebo déle při teplotě -20°C. Musí se zamezit opakovanému zmrazení a rozmrazení.

### Poznámky k provedení testu

Nepoužívejte žádná činidla po uplynutí doby použitelnosti vtištěné na štítku.

Jednotlivé komponenty soupravy jsou dokonale vzájemně sladěny. Pokud se zamění nebo smíchají komponenty z různých šarží, společnost DiaSorin S.p.A. nenesie žádnou odpovědnost za přesnost výsledků.

Ve větších testovacích sériích se činidla se stejným označením šarže kombinují.

Je nutné dodržet vyznačenou posloupnost jednotlivých kroků.

Vzorky pacientů o koncentraci vyšší než je měřicí rozsah se musí označit jako "> nejvyšší standard". Výsledek se nesmí extrapolovat. Příslušný vzorek pacienta se musí zředit a znovu otestovat. Další informace lze získat v oddělení zákaznických služeb společnosti DiaSorin S.p.A..

## Stabilita a skladovací podmínky

Všechna činidla a potažené zkumavky uchovávejte až do doby použití při teplotě 2 až 8°C v původních přepravních obalech. Dodržte doby použitelnosti uvedené na hlavním obalu a na štítcích lahvíček. Doba použitelnosti soupravy je určena dobou použitelnosti indikátoru.

## Postup testu

### Příprava

- Umožněte, aby se všechna činidla v soupravě (kromě precipitantu, který se musí před použitím udržovat v chladu) a vzorky pacienta zahřály na pokojovou teplotu. Mírně je zamíchejte (zamezte tvorbě pěny).
- Rekonstitujte TSH receptor (viz poznámku v části "Stabilita a podmínky uchování").
- Pokud je k přípravě příslušné šarže potřebná jedna nebo více lahvíček příslušných komponent, odpovídající činidla je nutno zkombinovat a smíchat.
- Pokud dávka překročí kapacitu centrifugy, dávku je třeba rozdělit. V tomto případě je nutno provést oddělené série standardů pro každou dávku.

1. Očísľujte vzestupně zkumavky (a, b pro duplikáty).
2. Napipetujte **50  $\mu\text{L}$  TRAK standardů** do zkumavek 0 a, b až 5 a, b, ve vzestupných koncentracích. Napipetujte **50  $\mu\text{L}$  vzorků pacientů nebo 50  $\mu\text{L}$  kontroly** do zkumavek 6 a, b atd.
3. Rekonstitujte TSH receptor (přenešte 1,5 mL pufru H do každé lahvičky s komponentou L, lehce zamíchejte, aniž by došlo k tvorbě pěny). Ihned poté napipetujte **50  $\mu\text{L}$  rekonstituovaného TSH receptoru** do každé zkumavky a zamíchejte.
4. Zkumavky jsou inkubovány **15 minut při pokojové teplotě (17-27°C)**.
5. **100  $\mu\text{L}$  indikátoru** (komponenta A) se napipetuje do každé zkumavky a poté lehce zamíchá.
6. Zkumavky jsou inkubovány **2 hodiny při pokojové teplotě (17-27°C)**.
7. Do každé zkumavky přidejte **2 mL chlazeného precipitantu** (2-8°C, komponenta P). K tomuto účelu je vhodné použít dávkovací zařízení.
8. **Okamžitě** po kroku dávkování se zkumavky centrifugují pokud možno chlazené po dobu nejméně 20 minut při 2000 x g nebo nejméně 10 minut při 2500 x g. Pokud v laboratoři není k dispozici chlazená centrifuga, je třeba předchladit alespoň držáky centrifugy.  
Vzorec pro g:  $g = 11,18 \cdot 10^{-6} \cdot r \cdot n^2$   
kde:  $r = \text{poloměr centrifugace v cm}$   
 $n = \text{ot/min} = \sqrt{\left(\frac{g}{11,18 \cdot 10^{-6} \cdot r}\right)}$
9. Po centrifugaci zcela **dekantujte** supernatant (aspirace se nedoporučuje) a otočte zkumavky dnem vzhůru na savý papír (alespoň na 5 minut, ne však déle než 15 minut), aby se odstranily veškeré kapičky.
10. Detektorem záření gama se změří radioaktivita. **Doporučená doba odečtu je 1 minuta.**

### Dodatečně požadováno

- 100 zkumavek s kulatým dnem (12 x 75 mm)
- mikropipety (50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$ )
- dávkovač (2 mL)
- centrifuga (minimálně 2000 x g)
- detektor záření gama

**TSH receptor použijte bezprostředně po rekonstituci (stabilita: max. 30 min). Nerekonstituovaný TSH receptor okamžitě zmrazte. Zmražený (-20°C) lze uchovávat do konce doby použitelnosti. Musí se zamezit opakovanému zmrazení a rozmrazení.**

## Charakteristiky testu

### • Přesnost v rámci testů

Hodnoty pacientů uvedené níže byly určeny v jedné sérii analýz u 10ti násobného určení.

Pacient	Průměr [U/L]	Standardní odchylna [U/L]	Variační koeficient (%)
1	13,6	0,92	6,8
2	24,0	1,73	7,2
3	32,9	1,83	5,6
4	118,5	6,04	5,1

### • Přesnost mezi testy

Hodnoty pacientů uvedené níže byly určeny dvojmo v 10 sériích analýz.

Pacient	Průměr [U/L]	Standardní odchylna [U/L]	Variační koeficient (%)
1	15,7	2,05	13,1
2	22,7	2,33	10,2
3	35,0	4,31	12,3
4	51,9	6,88	13,2

### • Senzitivita

**Analytická senzitivita** odečtená z optimální křivky je **2,4 U/mL**. Vycházela ze 40ti násobného stanovení nulového standardu tak, jak je uvedeno níže: x cpm – 2 s odchylna v cpm (počet odčítacích impulzů za minutu).

**Senzitivita funkční analýzy** (20% variační koeficient mezitesty) je **přibližně 8 U/L**.

## Výpočet výsledků

Pro počítačové vyhodnocení je třeba vybrat hodnotící program (spline/unsmoothed), který vyhovuje specifické kombinaci procesoru a použitého měřicího zařízení.

Při počítání výsledků THYBIA bez použití počítače se musí průměrná četnost pulsů za minutu (cpm) u standardů, kontrol a vzorků pacientů kalibrovat vůči průměrné četnosti pulsů nulového standardu ( $B_0$ ) a relativní vazebný poměr se vypočítá v (%):

$$\frac{B}{B_0} (\%) = \frac{\text{cpm vzorku}}{\text{cpm nulového standardu}} \times 100$$

Výsledné relativní vazebné hodnoty standardů se vynesou do grafu na lineární osu Y vůči koncentraci standardů na logaritmické ose X za účelem získání standardní křivky. Lze použít lineární nebo semilogaritmický milimetrový papír. Je-li možné, nakreslí se standardní S-křivka použitím standardních koncentrací. TRAb hodnoty vzorků (U/L) lze z tohoto grafu přímo odečíst prostřednictvím vypočítaného vazebného poměru.

Ohledně technické podpory kontaktujte prosím zákaznický servis společnosti DiaSorin S.p.A. nebo příslušného distribučního partnera / obchodního zástupce.

### Příklad výpočtu

Zkumavky	cpm (a)	cpm (b)	cpm (průměr)	B/B <sub>0</sub> (%)
Nulový standard 0	10 165	10 247	10 206	100,0
Standard 1 [5 U/L]	9 445	9 395	9 420	92,3
Standard 2 [15 U/L]	8 241	8 170	8 206	80,4
Standard 3 [45 U/L]	5 570	5 636	5 603	54,9
Standard 4 [135 U/L]	2 661	2 503	2 582	25,3
Standard 5 [405 U/L]	1 187	1 242	1 215	11,9
Vzorek pacienta X	4 947	4 851	4 899	48,0

### • Zkřížená reaktivita

Kontaminant	Maximální přípustná koncentrace bez nebezpečí interference v soupravě THYBIA
Lidský TSH	≤ 1 000 mU/L
Lidský LH	≤ 9 000 U/L
Lidský FSH	≤ 15 000 U/L
Lidský CG	≤ 50 000 U/L
Lidský thyroglobulin	≤ 10 mg/mL

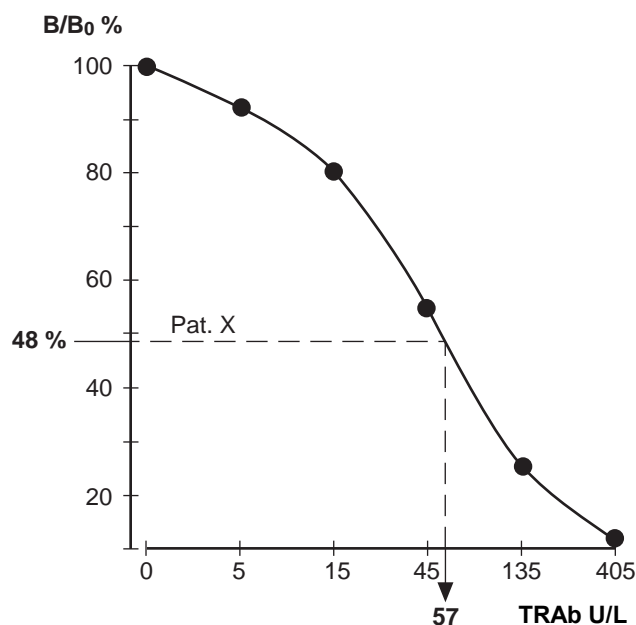
U produktu THYBIA nedochází k žádné interferenci s protilátkami proti thyroideální peroxidáze (anti-TPO) a protilátkami proti thyroglobulinu (anti-Tg).

### • Ředění

Pacient	Ředění	Zjištěná hodnota [U/L]	Očekávaná hodnota [U/L]	Regenerace (%)
1	neředěné	173,1	173,1	100
	1:2	85,2	86,6	98,4
	1:4	43,6	43,3	100,8
	1:8	21,1	21,6	97,5
2	neředěné	324,2	324,2	100
	1:2	159,5	162,1	98,4
	1:4	82,3	81,1	101,5
	1:8	40,4	40,5	99,7

TRAb-positivní vzorky lze naředit použitím THYBIA nulového standardu nebo TRAb negativního séra pacienta. Z důvodu heterogenity autoprotilátek je u některých vzorků pacientů možné nelineární ředění.

### Standardní křivka



Pro vzorek pacienta X a koncentraci TRAb je stanovena hodnota 57 U/L.