



Анти-тироидпероксидаза (Anti-TPO)

ELISA

Приложение:

За количествено определяне на тироид пероксидаза (ТРО) антитела в човешки серум чрез ензимен имуноанализ на микроплаката. Измерването на автоантителата на ТРО се прилага за установяване на някои заболявания, напр. Болестите на Хашимото и Грейв както и за нетоксични образувания в същата област.

Резюме и описание на анализа

Антителата на Тироид Пероксидазат (95%), идеопатичния миедем (90%) и болестта на Грейвс (80%). Фактически 72% от пациентите с позитивен анти-ТРО показват някакво степен на нарушение на тироидната функция. Затова клиничното изследване е особено важно за тироидната дисфункция.

Ензимният имуноанализ на Fortress е оптимално чувствителен само с няколко манипулации. При този метод разрежданият спесимен или контролата първо се нанася на микроплаката. Биотинилирания ТРО антиген се добавя и се смесват реактантите. Реакцията протича между антителата на ТРО и биотинилирания ТРО до образуването на имунен комплекс, който се нанася на повърхността на стрептавидин натоварените кладенчета чрез високо афинитетна реакция на биотин и стрептавидин.

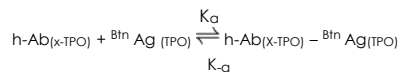
След необходимата инкубация и аспирирането на излизното количество се добавя анти-човешки IgG конюгат. Ензимната активност се определя чрез реакция със субстрата до получаването на оцветяване.

Принцип

Секвениран Elisa метод:

Реагентите включват имобилизиран антиген, циркулиращо антитяло и ензимно-свързано специфично антитяло.

Реакцията се изразява със следното уравнение:



$B^{in} Ag_{(TPO)}$ = Biotinylated Antigen (постоянно количество)

$h-Ab_{(x-TPO)}$ = Human Auto-Antibody (променливо количество)

$Ab_{(x-TPO)} - B^{in} Ag_{(TPO)}$ = Immune Complex (променливо количество)

K_a = Rate Constant of Association

K_d = Rate Constant of Disassociation

След препоръчаното инкубиране кладенчетата се измиват за да се отстранят излизните компоненти. Ензимно-свързаното антитяло (anti-h-IgG) се добавя към кладенчето и конюгатът се свързва с имунния комплекс който се е образувал.

$I.C. (h-IgG) + ENZ Ab_{(x-h-IgG)} + ENZ Ab_{(x-h-IgG)} - I.C. (h-IgG)$

$I.C. (h-IgG)$ = имобилизиран имунен комплекс (променливо количество)

$ENZ Ab_{(x-h-IgG)}$ = конюгат ензим-антитяло (постоянно количество)

$ENZ Ab_{(x-h-IgG)} - I.C. (h-IgG)$ = Ag-Ab комплекс (променливо количество)

Ензимният конюгат anti-h-IgG който се свързва с имунния комплекс при второто инкубиране се отделя отново с измиване. Ензимната активност на тази фракция е право-пропорционална на концентрацията на антитялото в спесимена.

РЕАГЕНТИ

Съхранение на 2-8°C

(Anti-TPO) Компоненти	обем
Anti-TPO калибратор 6 нива	6 x 1ml
TPO Biotin reagent	1x13ml
Anti-TPO ензимен реагент	1x13ml
Микроплака, натоварена със стрептавидин	96 Wells
Миешц концентрат	1x 20ml
Дилуент за серум	1x20ml
Субстрат А	1x7ml
Субстрат В	1x7ml
Стопирещ разтвор	1x8ml
Инструкция	1

Заб.1

Не използвайте реагенти с изтекъл срок на годност

Заб. 2

Реагентите са стабилни 60 дни при 2-8°C.

Заб. 3

Количеството е за една 96-ямкова плака.

Заб. 4

Калибраторите са на база човешки и са по стандарт A65/93 за анти-тироидна пероксидазна активност.

Също необходими:

1. Пипета за обем 10 & 50µl с точност над 1.5%.
2. Диспенсери за пипетиране от 0.100ml и 0.300ml с точност над 1.5%.
3. миялна или гутатор (по избор).
4. Четеч на микроплаки с дължина на върната 450nm и 620nm.
5. Асорбираща хартия за пипиране на кладенчетата.
6. при инкубацията.
7. Вакуумен аспиратор – по желание – за измиванията.
8. Епруветки за разреждането на пробата.
9. Хронометър.
10. Контролни материали.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

Само за Vitro диагностика

Да не се прилага нито вътрешно нито външно на хора и животни

Всички компоненти съдържат човешки серум но са измивани и не съдържат повърхностен антиген на хепатити В, HIV 1&2 и HCV
Антителата са от реагенти, лицензирани от FDA.

ВЗЕМАНЕ НА ПРОБАТА И ПОДГОТОВКА

Използвайте кръвна проба и прилагатите правилата за работа с венозна кръв, за предпочитане пробата да бъде взета сутрин, в епруетка без добавки и антикоагуланти, с червена капачка. Оставете кръвната проба да коагулира.

Центрофугируйте спесимена да отделите серума. Пробите могат да се съхраняват в хладилник при 2-8°C максимум до 5 дни. Ако не може да направите анализа през това време можете да замразите пробите -20°C до 30 дни. Избягвайте замразява и размразявате. Ако правите анализ на две проби ви е необходим спесимен for 0.050ml.

ПОДГОТОВКА:

1. Дилуент

Разтворете серумния дилуент с 200ml в подходяща епруетка с дестилирана или де-йонизирана вода. Съхранявайте на 2-8°C.

2. Миешц буфер

Разтворете съдържанието на миешкия концентрат до 1000ml с дестилирана или дейонизирана вода в подходящ за съхранение съд. Съхранявайте на стайна температура 20-27°C до 60 дни.

3. Работен разтвор

Налейте съдържанието на флакона „А“ във флакона с етикет разтвор „В“ Поставете жълтата капачка на празния флакон за лесно идентифициране. Смесете и сложете етикет, съхранение съответно на 2-8°C до 60 дни.

Забележка: Не използвайте работния субстрат ако има синкав цвят.

4. Разреждане на пациентската проба (1/100)

Накапете по 0.010ml (10µl) от всяка проба в 1ml серумен разтвор. Покрийте и разметете добре чрез инверсия. Съхранявайте на 2-8°C до 48 часа.

ПРОЦЕДУРА

Преди за направите анализа оставете на стайна температура (20 - 27° C) всички компоненти и контроли.

1. Отделете кладенчетата за всеки серум, контрола и пациентски спесимен така, че да направите дублиращ анализ. **Неизползваните стрипове поставете отново в алуминиевото плоче и съхранявайте на 2-8°C.**

2. Пипетирайте 0.025ml (25µl) от съответния серумен референт, контролата или спесимена в определеното кладенче.

3. Прибавете 0.100 ml (100µl) от ТРО Biotin реагента във всяко кладенче.

4. Разкачете микроплаката леко за 20-30 сек за да размесите и покрийте.

5. Инкубирайте 60 мин на стайна температура.

6. Излейте съдържанието на микроплаката или аспирирайте. Можете да използвате попивателна ако само изливате плаката.

7. Прибавете 300µl миешц буфер (виж раздела Подготовка на реагентите), излейте и поийте или аспирирайте. Повторете от 2. за да направите общо 3 измивания.

Може да използвате автоматична или мануална миялна като следвате съответните инструкции. Ако използвате гутатор избягвайте образуването на мехурчета при изправянето на миешкия разтвор. Излейте миешкия разтвор и направете това още 2 пъти.

8. Прибавете 0.100ml (100µl) от ТРО ензимния реагент във всички кладенчета. Винаги работете в една и съща последователност за да намалите разликите във времето на реакцията в различните кладенчета.

НЕ РАЗКЛАЩАЙТЕ ПЛАКАТА СЛЕД ДОБАВЯНЕТО НА ЕНЗИМА.

9. Икубирайте 30 мин на стайна температура.

10. Повторете стъпки 6& 7 както по-горе.

11. Прибавете 0.100µl от работния субстрат към всички кладенчета (раздел Подготовка на реагентите). Винаги прибавяте реагентите в същата последователност за минимални разлики в във времето на реакция между кладенчетата.

НЕ РАЗКЛАЩАЙТЕ ПЛАКАТА СЛЕД ДОБАВЯНЕТО НА ЕНЗИМА.

12. Инкубирайте на стайна температура 15 мин.

13. Прибавете 0.050 ml (50µl) от стопиращия разтвор към всяко кладенче и леко разкачете за 15-20 сек. Винаги прибавяте реагентите в същата последователност за минимални разлики в във времето на реакция между кладенчетата.

14. Отчетете абсорбцията във всяко кладенче на 450nm (използвайте референтна дължина 620-630nm за неутрализиране разликите между кладенчетата) в четеч на микроплаки.

Резултатът трябва да бъде отчетен в рамките на 30 мин след прибавянето на стопиращия разтвор.

Забележка: при повторното анализиране на спесимени с концентрация над 500IU/mg разрежете пробата допълнително 1:5 на 1:10 като използвате първоначално разреждения материал. Умножете по фактора на разреждането за да получите концентрацията на спесимена.

КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

Всяка лаборатория трябва да анализира контроли в нормалната, граничната и високата област за мониториране на провеждания анализ. Стойностите на тези контроли трябва да бъдат третираны като неизвестни и стойностите да бъдат определяни при всяка провеждана процедура. Картите на качествения контрол трябва се пазят за да следите работата на реагентите. Използвайте статистически методи за проследяване. Всяка лаборатория трябва да има своите приемливи граници на резултатите. Освен това максималната абсорбция трябва да съответства на вече добития опит. Значителното отклонение от установените нива може да е показателно за незабелязани отклонения от установените практики или влошаване на качеството на реагентите. Използвайте пресни реактиви за да установите причината за разликите.

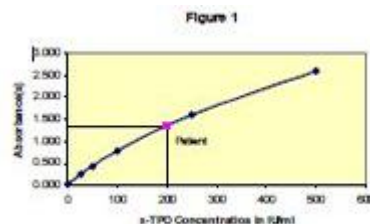
РЕЗУЛТАТИ

Кривата доза-отговор се използва да потвърждаване на концентрацията на ТРО в неизследван спесимен.

1. Запишете стойностите на абсорбцията, получени на принтера на микрочетеца, пример 1.
2. Начертайте кривата като използвате средната абсорбция на всеки двойно-анализиран серум спрямо съответната анти- ТРО в IU/ml на милиметрова хартия.
3. Начертайте кривата по отбелязаните точки (виж фиг.1)
4. За да определите нивото на анти- ТРО активността на неизследван спесимен нанесете средната абсорбция на двата анализа за всеки неизвестен на вертикалната ос на графиката, намерете пресечната точка на кривата и отчетете концентрацията (в IU/ml) на хоризонтала. При следния пример средната абсорбция (1;323) съответства на кривата на 200 IU/ml анти- ТРО концентрация (фиг.1).

ИД на пробата	№ на кладенчето	Abs (A)	Средна абс (A)	Обем IU/ml
CAL A	A1	0.022	0.026	0
	B1	0.03		
CAL B	C1	0.24	0.244	25
	D1	0.247		
CAL C	E1	0.437	0.43	50
	F1	0.422		
CAL D	G1	0.795	0.788	100
	H1	0.782		
CAL E	A2	1.61	1.59	250
	B2	1.572		
CAL F	C2	2.659	2.6	500
	D2	2.533		
Patient	E2	1.294	1.323	200
	F2	1.351		

* Данните за пример 1 и фиг. 1, **не трябва** да се приемат за действителни за стандартна крива за извършен анализ.



Параметри на камествения контрол – за да са валидни резултатите трябва да са изпълнение следните критерии:

1. Абсорбцията на калибратора (ОД) 'F' трябва да бъде ≥ 1.3 .
2. Четири от общо 6 качествени контрола трябва да бъдат в рамките на установения обхват.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. За възпроизводимостта е важно времето на реакцията във всяко кладенче да е еднакво. Пипетирането на пробите да не е над 10 мин за да не се удължи анализа. Ако анализирате повече от 1 плака по-добре да начертаете нова крива. С прибавянето на субстрата се стартира кинетична реакция, която се прекратява с прибавянето на стопиращия разтвор. Затова добавянето на субстрата и стопиращия разтвор трябва да бъде в същата

последователност за да се избегне разликата във времето на реакцията.

3. Апаратите измерват вертикално, не докосвайте дъното на кладенчето.

4. Ако не излезете добре съдържанието чрез наклоняване или аспириране при отделните измервания може да не получите верни резултати или разминаване при двойните анализи.

5. Много високата концентрация на анти-ТРО в спесимена може да замърси пробите, направени впоследствие след това и могат да са показателни за кръстосано замърсяване. Повтаряйте всяка проба, направена след спесимен показал абсорбция над 3.0 единици.

6. Пробите, които са с микробиологично замърсяване не трябва да се анализират.

Интерпретиране

1. Ако използвате компютърно редуциране на резултатите задължително е предполагаемите стойности на калибрацията да бъдат в рамките на 10% от получените концентрации.

2. Наличието на автоантитела на ТРО е сигурно когато нивото на серума е над 40IU/ml. Клиничното значение на резултатите заедно с активността на анти-ТРО активността трябва да се използва за оценка на тироидното състояние. Въпреки това клиничното заключение не трябва да се основава само на този резултат а да е свързан с другите показатели на пациента и другите анализи.

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

Направени са изследвания за определяне на очакваните стойности на анти-Tg с тази методика. Броят (n), средното (x) и стандартното отклонение са дадени в табл. 1. Стойностите надвишаващи 125 IU/ml се приемат за положителни за наличието на анти- ТРО автоантителата.

Таблица 1
Очаквани нива на анти -ТРО.(In IU/ml)

брой	100
средно	17.6
Стандартно отклонение	10.8
Над 95% (+2SD) ниво	39.2

Важно е да се има предвид, че има определен обхват, който може да бъде установен с даден метод за даден брой пациенти, считани за здрави; спецификата на метода, изследваните пациенти и точността на метода зависят от специалистите, провеждащи изследването. По тази причина всяка лаборатория трябва да има предвид очакваните стойности, определени от производителя само до установяването на свои стойности за даден метод и населението на района в който се работи.

ХАРАКТЕРИСТИКИ

A. Прецизност

Три различни нива контролни серуми бяха използвани за определяне точността на анализа.

Таблица 2
Точност при анализ (IU/ml)

проба	брой	средно	SD	CV
Pool 1	20	25.5	1.5	5.7%
Pool 2	20	120.5	4.6	3.8%
Pool 3	20	352.4	14.8	4.2%

Таблица 3
Точност между анализи (IU/ml)

проба	брой	средно	SD	CV
Pool 1	10	26.5	1.8	6.8%
Pool 2	10	118.5	5.3	4.5%
Pool 3	10	365.4	22.5	6.2%

В. Точност

Тест-системата анти- ТРО ELISA беше сравнена спрямо anti- ТРО Elisa Microplate. Биологични спесимени от здрави и болни пациенти бяха сравнявани. Статусът на болните включваше Хашомото тироидити, болестта на Грейвс, тироидни отоци и тироиден карцином. Общият брой на спесимените –82. Най-малкото квадратно регресивно уравнение и корелационния коефициент бяха сравнени за анти-ТРО и Elisa метод спрямо референтен метод. Резултатите са в табл.4

Таблица 4
Най-малък квадратен регресивен анализ

метод	средно	анализ	Корел. Коэф.
Fortress method	122.9	$Y=1.02(x) - 5.1$	0.989
Reference	127.0		

C. Чувствителност

Чувствителността на anti- ТРО Fortres Elisa е 1.5IU/ml.

D. Sensitivity

The Fortress Anti TPO Elisa test has a sensitivity of 1.5IU/ml.

E. Специфичност

Интерференции с ANA, DNA, ТРО и RA бяха незначителни.

РЕФЕРЕНЦИИ

1. Degroot LJ, ' Heterogeneity of human antibodies to TPO Thyroperoxidase'. Thyroid Autoimmunity, 207, 177-182 (1990)
2. Ekholm R, ' Biosynthesis of thyroid hormones '. Int Rev Cytol, 120, 243-288 (1990)