

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТИРЕОГЛОБУЛІНУ (Tg)

2225-300, Thyroglobulin (Tg) Test System

Каталог. №: 2225-300

Кількість : 96

Виробник : **Monobind Inc., (США)**

Методика від 05-29-2012

Версія 3



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Тест призначений для кількісного визначення рівнів Тиреоглобуліну (ТГ) в людській сироватці.

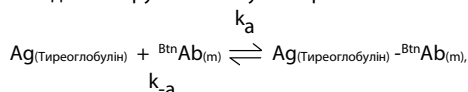
2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (тип 4):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до ТГ.

При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген ТГ, між ТГ антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

Ag_{Tg} = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{Ag}_{(\text{Тиреоглобулін})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_a = Константа швидкості дисоціації

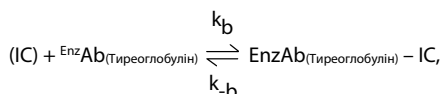
$\text{Ag}_{(\text{Тиреоглобулін})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{m})} + \text{Стрептавідин}_{\text{с.в.}} \Rightarrow \text{іммобілізований комплекс (IC)}$,

$\text{Стрептавідин}_{\text{с.в.}}$ = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхню лунок.

Одночасно в лунках утворюється комплекс при реакції високоафінного стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від незв'язаних антигенів декантацією або аспірацією. На наступному етапі додаються інші антитіла (специфічні до іншого епітопу), мічені ферментом. В осередках утворюється комплекс [антитіло-антиген-біотинильоване антитіло]. Надмірна кількість ферментного кон'югату видаляється промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл визначається в реакції з відповідною кількістю субстрату, вона прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.



де $\text{E}^{\text{nz}}\text{Ab}_{(\text{Тиреоглобулін})}$ = фермент-мічені антитіла (надлишкова кількість);

$\text{E}^{\text{nz}}\text{Ab}_{(\text{Тиреоглобулін})} - \text{IC}$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_b = константа швидкості дисоціації

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Тиреоглобуліну – 1 мл у флаконі

Шість флаконів контролей для антигена Тg з концентраціями **0 (A), 2.0 (B), 10.0 (C), 40 (D), 100 (E) і 250 (F)** нг/мл. Містять консервант.

Міжнародно визнаного стандарту Тиреоглобуліна не виявлено. Стандарти ТГ на основі сироватки - високоочищений препарат людського ТГ, гравіметрично калібрований по референс-матеріалу, отриманому в Співтоваристві референс-бюро № CRM 457.

B. Біотиновий реагент х-Тg – 13 мл у флаконі

Один флакон, що містить анти-Тиреоглобулін-антитіла, біотинильовані моноклональні мишачі IgG в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

C. Ферментний реагент Тg – 13 мл у флаконі

Один флакон, що містить мічені пероксидазою антитіла IgG проти Тиреоглобуліну в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

D. Планшет, покритий Стрептавідином – 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

F. Реагент субстрату – 12 мл у флаконі

Один флакон, що містить ТМБ і перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

G. Стоп-розчин – 8.0 мл у флаконі

Один флакон, що містить сильну кислоту (H₂SO₄). Зберігати при 2-30 °С.

H. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Мікродозатори на 50 і 100 мкл з точністю вищою 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гіршою 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка.
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор (опційно) для кроків промивання.
8. Таймер.
9. Ємність для зберігання Промивного Буфера.
10. Дистильована або деіонізована вода.
11. Контрольні матеріали.

5. ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Набір призначений тільки для діагностики in-vitro.

Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, NHS.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать кров, сироватка. Повинні дотримуватися звичайних застережних заходів. Для належного порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8°C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °С на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях потрібно 0.100 мл сироватки.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю з рівнями низьким, нормальним і високим для відстеження характеристик набору. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що постачаються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або розкладанні реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Розчин для промивання

Вилийте вміст концентрату розчину для промивання в посудину об'ємом 1000 мл. Розбавте до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (20-27 °C) до 60 днів.

Зауваження 1: не використовуйте робочий розчин субстрату, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ (час проведення 4 години 15 хвилин)

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролю для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.**
- Додайте піпеткою по 50 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків в відповідні лунки.
- Додайте піпеткою по 100 мкл Реагенту x-Tg Biotin в кожну лунку. **Дуже важливо піпетувати всі реагенти близько до дна лунки.**
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
- Інкубуйте 2 години при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальної папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний чи ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутла, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще два рази.**
- Додайте піпеткою по 100 мкл Ферментного Реагенту ТГ в кожну лунку (див. "Приготування реагентів").

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТУ

- Накрийте його пластиковою плівкою і інкубуйте 120 хвилин при кімнатній температурі.
- Повторіть кроки 6 і 7.
- Додайте піпеткою по 100 мкл Субстрату в кожну лунку. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Накрийте його пластиковою плівкою і інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну клітинку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте осередку протягом 15-20 секунд. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**
- Виміряйте величини поглинання вмісту осередків на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводить при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

9.1 АЛЬТЕРНАТИВНА ПРОЦЕДУРА (час проведення 2 години 15 хвилин)

Ця процедура проводиться за допомогою лабораторного гематологічного шейкера.

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролю для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і щільно закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.**
- Додайте піпеткою по 50 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.

- Додайте 100 мкл біотинильованих антитіл в кожну клітинку. **Дуже важливо додавати все реагенти близько до дна мікролунок.**
- Інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі на гематологічному шейкері при 150 об/хв.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальної папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний чи ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутла, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще два рази.**
- Додайте піпеткою по 100 мкл Ферментного Реагенту ТГ в кожну лунку.
- Інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі на гематологічному шейкері при 150 об/хв.
- Повторіть кроки 5-6, як описано в процедурі вище.
- Проведіть кроки 11-14 для розвитку кольору і вимірювання результатів.

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Тиреоглобуліну в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх осередків як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації Тг в нг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте невідомі концентрації Тг в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція (0424) перетинає стандартну криву при 25.2 нг/мл (див. мал.1).

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Значення (нг/дл)
Калібратор А	A1	0.047	0.047	0
	B1	0.047		
Калібратор В	C1	0.093	0.091	2
	D1	0.090		
Калібратор С	E1	0.221	0.217	10
	F1	0.214		
Калібратор D	G1	0.612	0.625	40
	H1	0.634		
Калібратор E	A2	1.343	1.339	100
	B2	1.335		
Калібратор F	C2	2.596	2.577	250
	D2	2.557		
Контроль 1	E2	0.142	0.146	4.99
	F2	0.150		
Контроль 2	G2	1.622	0.876	125.0
	H2	1.566		
Пацієнт 1	A3	0.426	0.424	25.2
	B3	0.422		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1 (Див. оригінал інструкції).

11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність калібратора А має бути < 0.10.
- Оптична щільність калібратора F має бути ≥ 0.10.
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12. ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

12.1 . Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.

- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки пацієнтів з концентраціями Тиреоглобуліну вище 250 нг/мл можна розводити з нульовим Калібратором і аналізувати повторно. Отриманий результат помножити на коефіцієнт розведення.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

У клінічних дослідженнях від Monobind і відповідно з літературними даними був встановлений нормальний рівень для дорослого населення: 3.5 – 56 нг/мл.

Тиреоглобулін підвищений при фолікулярній і папілярній карциномах, аденомі щитовидної залози, підгострому тиреоїдиті, тиреоїдиті Хашімото, хворобі Грейвса.

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору Tg всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (нг/мл)

Взорець	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	22	6.2	0.41	6.6
Пул 2	22	64.4	2.23	3.6
Пул 3	22	194.1	8.17	4.2

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (нг/мл)

Взорець	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	10	5.8	0.52	9.0
Пул 2	10	62.2	3.82	6.1
Пул 3	10	192.3	10.90	5.7

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублікатах на протязі семи днів.

14.2 Чутливість

Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового Калібратора (нг/мл) плюс 2σ (стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі для підрахунку мінімальної дози. Чутливість аналізу складала 0.44 нг/мл.

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним радіоімунним методом. Використовувалися зразки сироваток симптоматичної і асимптоматичної популяцій. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	13.6	$y = 2.55 + 0.908(x)$	0.975
Референсний	11.4		

Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції з іншими імуноглобулінами були оцінені додаванням в сироваткову матрицю цих сполук у зазначених концентраціях вище фізіологічних. Перехресна реактивність розраховувалася як співвідношення дози інтерферуючої речовини до дози тиреоглобуліну, необхідної для досягнення такої ж абсорбції.

Речовина	Концентрація	Перехресна реактивність
ТГ	100 нг/мл	100.0%
Трийодотиронін	1000 нг/дл	-
Тироксин	1000 нг/мл	-
TBG	100 нг/мл	-

14.5 Ефект високої дози

Так як набір заснований на послідовному методі, високі концентрації ТГ не показують Хук-ефекту. Зразки з концентраціями вище 50 000 нг/мл демонстрували екстремально високі рівні абсорбції.



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м.Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com



© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»