



Набор для определения АНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ Anti-Thyroglobulin

Кат. № : 101-4110
Количество тестов : 96
Производитель : DRG, (USA)

Методика от 17/04/06

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ для количественного измерения уровня антител к тиреоглобулину в человеческой сыворотке или плазме.

ПРИНЦИП

Необходимы реагенты для последующего анализа Эллиса включают иммобилизованный антиген, циркулирующие антитело и ферментно связанное специфическое антитело. В этой процедуре иммобилизация имеет место во время анализа на поверхности микропланшетных лунок через взаимодействие стрептавидина, привитого к лункам и экзогенно доданного биотинилированного антигена тиреоглобулина.

При смешивании моноклонального биотинилированного антитела, фермента антитела и сыворотки в которой находится природный антиген, результаты реакции между природным антигеном и антителами без конкуренции или помех формируют растворимый комплекс сэндвича. Взаимодействие показано на следующей схеме (см. оригинал инструкции).

После того, как равновесие достигнуто, фракция связанного антитела отделяется от несвязанного антигена декантацией или аспирацией. Активность энзима в фракции связанного антитела прямо пропорциональна концентрации природного свободного антигена. При использовании нескольких разных установленных сывороток с известной концентрацией антигена для построения кривой, можно получить концентрацию антигенов в неизвестных образцах и кривую дозы.

РЕАГЕНТЫ ДЛЯ МИКРОПЛАНШЕТА (96 ЯЧЕЕК)

1) Калибраторы Анти-тиреоглобулина – 1.0 мл/фл.

Шесть (6) флаконов для уровней Тиреоглобулина 0 (А), 50.0 (В), 125.0 (С), 500 (D), 1000 (Е), 2000 (F) нг/мл. Консервант додан. Хранить при 2-8 °С.

Примечание: НЕ существует известного, принятого во всех странах стандарта Тиреоглобулина. Тг, который используется в калибраторах на основании сыворотки – высококонцентрированный (98%), гравиметрически калиброванный на против референтного материала.

Исследование Стандарта А 65/93 для активности анти-тиреоглобулина.

2) **Biotin Конъюгат Тиреоглобулина – 13 мл/фл.**

Один флакон, содержащий биотинилированный тиреоглобулин в буферном матриксе и консервант. Хранить при температуре 2-8 °С.

3) **Enzyme antigen Конъюгат – 13 мл/фл.**

Один флакон, содержащий античеловеческое антитело IgG и пероксидазу хрена в буферном матриксе и консервант. Хранить при температуре 2-8 °С.

4) **Микропланшет** с ячейками, покрытыми стрептавидином, **96 лунок.**

Один микропланшет на 96 ячеек покрыт стрептавидином, запечатан в алюминиевый пакет с осушителем. Хранить при 2-8 °С.

5) **Концентрат разбавителя сыворотки – 20 мл**

Один флакон разбавителя сыворотки содержащий буферные соли и краситель. Хранить при 2-8 °С.

6) **Концентрат моющего раствора – 20 мл.**

Один флакон, содержащий поверхностно-активное вещество в фосфатно-буферном солевом растворе. Добавлен презерватор. Хранить при 2-30 °С.

7) **Субстрат А – 7,0 мл/фл.** Одна бутылка, содержащая ТМБ в буфере. Хранить при 2-8 °С.

8) **Субстрат В – 7,0 мл/фл.** Одна бутылка, содержащая перекись водорода (H₂O₂) в буфере. Хранить при 2-8 °С.

9) **Стоп раствор – 8,0 мл/фл.** Одна бутылка, содержащая сильную кислоту (1N HCl) в буфере. Хранить при 2-8 °С.

10) Инструкция

Замечание 1: не используйте реагенты после окончания срока пригодности.

Замечание 2: вскрытые реагенты стабильны 60 дней при 2-8 °С.

Замечание 2: все вышеуказанные реагенты предназначены только для одного микропланшета.

Необходимые, но не поставляемые.

1. Пипетки, способностью внесения объема 10 и 50 мкл с точностью более чем 1,5%.
2. Диспенсер для повторного внесения объема 0,100 мл и 0,300 мл с точностью более чем 1,5%.
3. Микропланшетный промыватель или сдавливающая бутылка (по возможности).
4. Микропланшетный ридер с длиной волны при 450 нм и 620 нм.
5. Абсорбирующая бумага для вытирания ячеек.
6. Пластиковая обертка или микропланшетный накрыватель для шага инкубации.
7. Вакуумный аспиратор (по возможности) для шага промывания.
8. Таймер.
9. Материалы контроля качества.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТЬ

Для диагностики "in vitro".

Не для внутреннего или внешнего применения на людях или животных.

С реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфицированными.

Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными. Описание лабораторных процедур

поведения с продуктами крови можно найти в Центре Контроля заболеваний.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови обычной венопункцией при соблюдении необходимых правил безопасности. Для получения точных результатов, необходима утренняя сыворотка пациента, который воздерживается от приема пищи. Кровь нужно собрать в обычную пробирку с красной полоской для венопункции, не используя никаких добавок или гелевых барьеров. Дайте возможность крови стечь. Центрифугируйте образец для отделения сыворотки от клеток. Образцы можно охлаждать до 2-8 °С на протяжении максимум 5 дней. Избегайте повторных замораживаний и размораживаний. При проведении повторного анализа необходимо 0,100 мл образца.

ПОДГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1. Разбавитель сыворотки

Разбавьте концентрат разбавителя сыворотки до 200 мл в подходящем контейнере дистиллированной или деионизированной водой. Храните при 2-8-°С.

2. Моющий буфер

Разбавьте содержимое моющего концентрата до объема 1000 мл дистиллированной или неионизированной водой в пригодном для хранения контейнере. Храните при комнатной температуре 20-27°С до 60 дней.

3. Рабочий раствор субстрата – готовьте в тот же день. Определите количество необходимого реагента и приготовьте смешиваниям в равных пропорциях субстрата А и субстрата В в подходящем контейнере. Смешайте и храните при 2-8°С. Используйте в течении 60 дней. Или для более длительного периода использования определите количество необходимого реагента и приготовьте смешиванием равных пропорций субстрата А и субстрата В. Например, добавьте 1 мл субстрата А и 1 мл В в восемь стрипов. (несколько избыточное количество раствора приготовлено).

Примечание: не используйте рабочий субстрат, если он голубого окраса.

4. Разбавление образца пациента – Разбавьте 0,010 (10 мкл) каждого образца пациента в 1 мл разбавителя сыворотки. Накройте и вортикулируйте полностью инверсией. Храните при 2-8-°С до 48 часов.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Приведите все реагенты, стандарты, контроли и образцы к комнатной температуре (20-27° С).

1. Приготовьте ячейки микропланшета для каждого стандарта сыворотки, контроля и образца для анализа в дубликаты. Не использованные стрипы вставьте назад в алюминиевый пакет, запечатайте и храните при 2-8°С.
2. Пипетируйте 0,050 мл (50 мкл) соответствующего стандарта сыворотки, контроля или образца в помеченные ячейки.
3. Добавьте 0,100 мл (100 мкл) Биотинилированного Раствора Конъюгата Тиреоглобулина.
4. Свихрируйте микропланшет осторожно 20-30 сек. для смешивания и накройте.

5. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре 22-25 °С.
6. Удалите содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. Промокните планшетку абсорбирующей бумагой, в случае декантации.
7. Добавьте **300 мкл** моющего буфера, декантируйте (спустите и промокните) или аспирируйте. Повторите это **два раза**, чтоб вместе получилось **три** промывания. Может использоваться автоматическое или ручное устройство для промывания. При этом следуйте руководству по эксплуатации производителя для точной процедуры промывания. При использовании бутылки со сдавливанием, наполните каждую ячейку при сдавливании контейнера (избегайте воздушных пузырей). Декантируйте промыватель и повторите еще дважды.
8. Добавьте **0,100 мл (100 мкл)** раствора энзима антитела Тg во все лунки. Всегда добавляйте реагенты в той же последовательности для минимизации различий во времени реакции между лунками.
9. Свихрируйте микропланшет осторожно, накройте пластиковой оболочкой. Инкубируйте при комнатной температуре 30 мин.
10. Повторите шаги 6 и 7.
11. Добавьте 0,100 мл (100 мкл) Раствора рабочего субстрата во все лунки. Всегда добавляйте реагенты в той же последовательности для минимизации различий во времени реакции между лунками.
12. Инкубируйте при комнатной температуре 15 мин.
13. Добавьте 0,50 мл (50 мкл) стоп раствора в каждую ячейку и осторожно смешайте 15-20 сек. Добавляйте в том самом порядке.
14. Считайте абсорбцию каждой ячейки при 450 нм микропланшетным ридером (используя установленную длину волны 620-630 нм для минимизации колебаний) в течении 30 мин.

ПРИМЕЧАНИЕ: для тестирования образцов с концентрацией больше 2000 IU/ml еще раз, разведите образец 1:5 или 1:10 спользуя оригинальный материал для разбавления. Умножьте на фактор разбавления для получения концентрации образца.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждой лаборатории следует установить свои диапазоны контролей при низких, нормальных и высоких показателях для мониторинга процедуры анализа. Эти контроли нужно обрабатывать как неизвестные и определять значения в каждой процедуре теста. Общие контроли качества нужно проводить для мониторинга серии анализов. Существенное отклонение от установленных результатов может указывать на незаметные изменения условий проведения анализа или же деградации реагентов теста. Для выяснения причины вариации результатов нужно использовать свежие реагенты.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения концентрации анти-тиреоглобулина в неизвестных образцах, нужно нарисовать кривую соотношения:

1. Пометьте абсорбцию полученную с распечатки микропланшетного ридера, как указано в примере 1.
2. Отметьте точками абсорбцию каждого дубликата стандартной сыворотки против соответствующей концентрации анти-Thyroglobulin в IU/ml на линейной графической бумаге.

- Проведите оптимальную кривую через отмеченные точки.
- Для определения уровня анти-тиреоглобулина в неизвестном, разместите среднюю абсорбцию дубликатов для каждого неизвестного по вертикале, найдите пересекающую точку на кривой и считайте концентрацию с горизонтальной линии графика. В следующем примере средняя абсорбция 1,387 при 790 IU/ml концентрации анти-тиреоглобулина.

Пример 1

Образец	Номер ячейки	Абс (A)	Среднее Абс. (B)	Значение (нг/дл)
Кал А	A1	0,022	0,025	1
	B1	0,028		
Кал В	C1	0,135	0,133	50
	D1	0,131		
Кал С	E1	0,280	0,270	125
	F1	0,261		
Кал. D	G1	0,962	0,949	500
	H1	0,936		
Кал. E	A2	1,709	1,703	1000
	B2	1,698		
Кал. F	C2	2,730	2,698	2500
	D2	2,667		
Пац.	E2	1,390	1,387	790
	F2	1,383		

Наведенные данные только для иллюстрации и не могут использоваться для вычисления результатов анализа.

Q.C. ПАРАМЕТРЫ

Для достоверности результатов, следующие критерии должны приниматься:

- Абсорбция калибратора 0 нг/мл должна быть $\geq 1,3$
- Четыре из шести калибраторов должны попадать в установленный диапазон.

ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

- Важно, что бы время реакции для каждой ячейки было стабильно.
- Пипетирование образцов не должно превышать 10 мин.
- Если используется более чем один планшет, необходимо строить еще одну кривую.
- Добавление раствора субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому добавление стоп раствора и субстрата нужно проводить с той самой частотой, что бы не допускать часовую девиацию во время реакции.
- Планшетный ридер измеряет вертикально. Не торкайтесь дна ячеек.
- Не правильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.
- Высокие концентрации анти-Тиреоглобулина в образцах пациента могут заражать образцы немедленно. Плохие дубликаты указывают на перекрестную контаминацию. Повтори любой образец, который характеризуется 3,0 абсорбцией.
- Образцы, которые являются загрязненными микробиологически, не должны использоваться.

Интерпретация

• Если для интерпретации результатов теста используется компьютерно контролируемые данные обязательно необходимо чтобы нормативные значения для калибраторов не выходили за грани 10% прописываемых концентраций.

• Присутствие антител к тиреоглобулину подтверждается когда уровень сыворотки превышает 125 IU/ml. Клиническая важность результата, вместе с активностью анти – тиреоидной пероксидазы, должны использоваться для оценки тиреоидного условия. Тем не менее, клинические выводы не должны базироваться только на этом тесте. Н должен использоваться скорее всего как дополнительный фактор установления диагноза.

• Преимущества должны рассматриваться с точки зрения использования тестирования антител к тиреоглобулину во взаимодействии с анти-тиреоидной пероксидазы (ТРО). Широко используемая практика проведения обоих тестов была оспорена.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Изучение обычного населения проводилось для определения ожидаемых значений для Микропланшетной тестовой системы на анти-тиреоглобулин. Количество (n), среднее значение (x) и стандартное отклонение (σ) даны в таблице 1. Значения до 125 IU/ml считаются позитивными на присутствие антител к анти-тиреоглобулину.

Табл 1 см. в оригинале инструкции.

Важно помнить, что установление граничных значений, которые можно получить при использовании данного метода для «нормального» населения зависит от множества факторов: специфичности методики, населения, которое исследуется, и точности метода при интерпретации индивидуальным лаборантом. Вот почему, каждая лаборатория должна использовать данные производителя только до того времени, пока не установит свои собственные граничные нормы.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА**Точность**

Внутри и между тестовая точность была определена при анализе двух разных уровней сыворотки. Число, среднее значение, стандартное отклонение, и коэффициент изменения для каждого контроля серы отображены в таблицах:

Таблица 2

Внутри тестовая точность (значения в нг/мл)

Образец	Число	Ср.Знач.	Ст.отклонен.	Коеф.кор%
Низкий	20	65,5	3,3	5,0
средний	20	385,5	15,5	4,0
Высокий	20	1554,4	55,4	3,6

Таблица 3

Между тестовая точность (значения в нг/мл)

Образец	Число	Ср.Знач.	Ст.отклонен.	Коеф.кор%
Низкий	10	66,8	3,6	5,3
средний	10	374,2	18,5	4,9
Высокий	10	1625,5	65,2	4,0

Как было измерено в 10 экспериментах в дубликаты на протяжении 7 дней.

Точность

Микропланшет анти-тиреоглобулина DRG был сравнен с похожим микропланшетом анти-тиреоглобулина Элліса. Использовались биологические образцы от здоровых и больных пациентов. Болезни: Тиреоидит Гашимото, Болезнь Грейвса, наросты щитовидной железы, рак щитовидной железы. Общее количество образцов составляло 82. Для анти-тиреоглобулина Элліса было вычислено коэффициент корреляции и

наименьшее квадратное регрессии в сравнении с данным методом. Данные находятся в Таблице 4 (см.оригинал инструкции). Некоторые расхождения указывают на близость средних значений. Наименьшее квадратное равенство регрессии и коэффициент корреляции указывает на позитивные стороны метода.

Чувствительность

Чувствительность набора составляет 5 нг/дл.

Специфичность

Реактивность с ANA, DNA, TPO и антителами ревматоида была выявлена небольшая в данном анализе.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола,97,
г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: +38 (0342) 77 51 22
Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.com