



НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОГЛОБУЛИНА

Кат. № : EIA-3377
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Методика от **04-2013**
Версия **4.0**

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

1. НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ является непрямым твердо фазовым иммуоферментным анализом для количественного измерения тиреоглобулина в человеческой сыворотке или плазме. Анализ предназначен только для диагностики *in vitro*.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Высоко очищенные анти-человеческие-тиреоглобулин антитела привиты к микроячейкам. Тиреоглобулин, если присутствуют в разбавленной сыворотке, связываются с микроячейками. Промывание микролунок удаляет несвязанные антитела сыворотки. Анти-человеческие тиреоглобулин конъюгированные пероксидазой хрена иммунологически связываются с связанным тиреоглобулином пациента, формируя антитело-конъюгат-тиреоглобулин комплекс. Промывание микролунок удаляет несвязанный конъюгат. Энзимный субстрат при присутствии связанного конъюгата гидролизуется до формирования голубого окраса. Добавления кислоты останавливает реакцию, формируя желтый конечный продукт. Интенсивность этого желтого цвета прямо пропорциональна концентрации тиреоглобулина, присутствующих в образце.

3. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Тиреоглобулин – многократно гликозилированный, растворимый в воде иодопrotein. Молекулярный вес около 660 000 Дальтон делится на две идентичные субъединицы. Тиреоглобулин синтезируется в тироцитах щитовидной железы и секретируется в полость тироидных фолликул. Иодирование тирозильных остатков белков приводит к предшественникам тироидных гормонов Т3 и Т4. Наконец свободные Т3 и Т4 освобождаются в циркуляции вместе с малыми количествами тиреоглобулина. Подобно Т3 и Т4 синтез и секреция тиреоглобулина контролируется ТТг и ТРГ. Подавляющая терапия с использованием тироидных гормонов также приводит к пониженным концентрациям тиреоглобулина в сыворотке.

Повышенные концентрации тиреоглобулина в сыворотке обнаруживаются при различных тироидных заболеваниях, таких как

- гипертиреоз
- нетоксический зоб
- тироидиты
- тироидная карцинома.

Определение тиреоглобулина – специальный прогностический инструмент у пациентов, леченных по поводу болезни Грейвса. Высокие уровни тиреоглобулина в конце тиростатической терапии свидетельствуют о раннем рецидиве болезни, в то время как постоянно низкие уровни тиреоглобулина прогнозируют тенденцию к выздоровлению.

Основное применение для определения тиреоглобулина – постхирургический мониторинг пациентов с тироидной карциномой. После тироид-эктомии, комбинированной с лучевой терапией для разрушения оставшихся тироидных тканей можно ожидать промежуточный пик вслед за быстрым уменьшением концентрации циркулирующего тиреоглобулина-на ниже предела детектирования тиреоглобулина. Каждое новое повышение тиреоглобулина в сыворотке свидетельствует о остаточных тироидных тканях, локальном рецидиве метастаз.

Благодаря легкости проведения мониторинга пациентов с тироидной карциномой определение тиреоглобулина – важная неинвазивная альтернатива и дополнение скинтиграфии с ¹³¹I.

4. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

1. **Разделяемый микропланшет**, состоящий из 12 стрипов по 8 лунок каждый, покрытых высокоспецифичными антителами к тиреоглобулину (поликлональными, кролячими)– 1 планшет. Готовый к использованию.
2. **Калибраторы** тиреоглобулина (A-F) в основе сыворотки/буфера PBS, BSA, NaN₃ < 0.1% (в/в), содержащие 0;

3; 10; 30; 100 и 300 нг/мл – 6 флаконов, 1,5 мл каждый. Готовы к использованию.

3. **Контроли** тиреоглобулина в основе сыворотки/буфера PBS, BSA, NaN₃ < 0.1% (в/в), положительный и отрицательный, определенные концентрации указаны в Сертификате контроля качества – 2 флакона, 1,5 мл каждый. Готовы к использованию.
4. **Контроль тиреоглобулина на извлечение**, в основе сыворотки/буфера (PBS, BSA, NaN₃ < 0.1% (в/в), содержит 50 нг/мл человеческого тиреоглобулина – 1 флакон, 3 мл. Готовый к использованию.
5. **Буфер образцов** (Tris, NaN₃ < 0.1% (в/в), желтый - 1 флакон, 20 мл. Готовый к использованию.
6. Раствор **ферментного конъюгата** (PBS, Proclin 300 < 0.5% (o/o)), светло-красный, содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие антитела к тиреоглобулину, меченые пероксидазой хрена - 1 флакон, 15 мл. Готовый к использованию.
7. Раствор **субстрата ТМБ** - 1 флакон, 15 мл. Готовый к использованию.
8. **Стоп-раствор** (содержит кислоту) – 1 флакон, 15 мл., готовый к использованию.
9. **Промывочный раствор**, (PBS, NaN₃ < 0.1% (в/в), концентрат (50x) - 1 флакон, 20 мл.

5. ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны измерения 450 нм;
- Многоканальный диспенсер или пипетка для дозирования на 100 мкл;
- Вихревой смеситель;
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл;
- Лабораторное часовое устройство;
- ПО для обработки данных;
- Дистиллированная вода;
- Мерные колбы на 100 и 1000 мл;
- Пластмассовый контейнер для хранения промывочного раствора.

6. СБОР, ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
2. Дайте возможность крови стуститься и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
4. Образцы должны храниться при 2-8^oC до 5 дней или при -20^oC до шести месяцев.
5. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
6. Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

7. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8^oC.
2. Держите лунки микропланшета герметично закрытыми в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока годности.
4. Не подавайте реагенты влиянию тепла, солнца или сильного света во время хранения или использования.
5. Разбавленные буфер образцов и промывочный буфер стабилен 30 дней при хранении при 2-8^oC

8. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
2. Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
3. Все материалы следует привести к комнатной температуре.
4. Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
5. Проводите все этапы анализа в указанном порядке.
6. Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
9. Очень важно промывать лунки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
10. Все этапы инкубации должны проводиться определенное время.
11. Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
12. Не используйте повторно лунки микропланшета.

9. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
3. 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.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Стоп раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный промывочный раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации в продукте тем не менее не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности.
7. Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
8. Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
9. Не пипетируйте ртом.
10. Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Соблюдайте указания по проведению контроля качества в медицинских лабораториях путем исследования контролей и/или объединенных сывороток. Во время обращения со всеми реагентами набора, контролями и образцами сыворотки соблюдайте имеющиеся нормы законодательства.

10. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**Промывочный раствор**

Перед использованием разбавьте дистиллированной водой содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера до конечного объема 1000 мл.

Буфер для образцов

Буфер для образцов готов к использованию.

11. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Использовать неразбавленные образцы.

Примечание: Калибраторы/Контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

12. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки калибраторов, контролей, неразбавленных проб пациентов (P) и пробы для тестов на извлечение (R) в дубляж.

1. Добавьте в лунки **50 мкл** калибраторов, контролей и образцов пациентов.
Добавьте **50 мкл** буфера для образцов к калибраторам, контролям и пробам пациентов (P1, P2 ...). Добавьте **50 мкл** контроля тиреоглобулина на извлечение к пробам пациентов (R1, R2 ...).
2. Инкубируйте **60 минут** при комн. температуре (20 - 28 °C).
3. Удалите содержимое лунок и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
4. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
5. Инкубируйте **60 минут** при комнатной температуре.
6. Удалите содержимое лунок и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
7. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую лунку.
8. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
9. Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку.
10. Инкубировать **5 минут** при комнатной температуре.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое считывание с фильтром сравнения 600-690 нм. **Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.**

	1	2	3	4	5	6
a	SA	SE	P1	P3		
b	SA	SE	P1	P3		
c	SB	SF	R1	R3		
d	SB	SF	R1	R3		
e	SC	C1	P2	...		
f	SC	C1	P2	...		
g	SD	C2	R2	...		
h	SD	C2	R2	...		

SA-SF – стандарты A-F

P1, P2 – образцы пациентов 1, 2

R1, R2 – добавленные образцы пациентов 1, 2

C1 – положительный контроль

C2 – отрицательный контроль

12.1 Тест на извлечение

Присутствие антител к тиреоглобулину может мешать определению тиреоглобулина в сыворотке.

На поверхности молекулы тиреоглобулина есть шесть иммуногенных эпитопа, с которыми могут связываться антитела с различными характеристиками связывания. Аутоантитела к этим эпитопам будут вызывать ложно отрицательные результаты, связывая эндогенный тиреоглобулин. Следовательно, необходимо доказать присутствие аутоантител в образцах пациентов. Это может быть сделано либо прямым количественным измерением анти-тиреоглобулина или непрямым способом, в экспериментах на извлечение в сочетании с количественным определением тиреоглобулина. Для этих экспериментов к пробе пациента добавляется экзогенный тиреоглобулин с определенной концентрацией. Извлечение экзогенного тиреоглобулина может быть рассчитано и обеспечить доказательство наличия аутоантител. Измерение дает корреляцию величин извлечения с концентрацией присутствующих антител.

Для теста на извлечение образцы следует измерять дважды – для прямого измерения и для пробы с добавленным тиреоглобулином. Процент извлечения рассчитывается по формуле, приведенной ниже:

$$\% \text{ извл.} = \frac{\text{нг/мл тиреоглоб. (с контр. на извлеч.)}}{\text{нг/мл тиреоглоб. (без контр. на извлеч.)} + 50} \times 100$$

13. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**12.1 Контроль качества**

Данное исследование действительно если ОП при 450 нм для повышенного (1) и нормального контроля (2) и калибраторов A-F соответствует диапазонам, указанным в сертификате контроля качества, что поставляется вместе с набором. Если критерии не соответствуют, результаты не пригодны, и тест необходимо повторить.

14. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации. Также возможно использование аппроксимации Smoothed Spline.

Рекомендуемое линейно-логарифмическое построение графика

Сначала рассчитайте средние оптические плотности для каждого калибратора. Используйте линейно-логарифмическую миллиметровку и отложите среднюю оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Проведите оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

15. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА**15.1 Калибровка**

Тест-система прокалибрована по Certified Reference Material CRM 457 из BCR, Брюссель для человеческого тиреоглобулина.

15.2 Диапазон измерения

Составляет 0- 300 нг/мл.

15.3 Ожидаемые значения

Cut-off: 0- 300 нг/мл.

15.4 Интерпретация результатов

В литературе сообщается о значениях cut-off для тиреоглобулина в сыворотке около 60 нг/мл с медианой от 5 до 10 нг/мл. У новорожденных и у беременных 3-его триместра могут наблюдаться высокие значения тиреоглобулина. Для правильной интерпретации концентрации тиреоглобулина необходима информация о

поступлении йода в организм. В регионах с эндемическим зобом уровни тиреоглобулина выше.

Настоящий набор дает значения тиреоглобулина у здоровых доноров от 2 до 50 нг/мл.

У пациентов с общей тиреодектомией после лучевой терапии тиреоглобулин не должен обнаруживаться. Любое повышение тиреоглобулина до детектируемых значений свидетельствует о рецидиве и метастазах.

15.5 Линейность

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями тиреоглобулина были разбавлены буфером для образцов и проанализированы. Анализ показывает линейность на всем диапазоне измерения.

См. таблицу в оригинале инструкции.

15.6 Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составляет 1 нг/мл.

15.7 Точность (воспроизводимость)

Статистика была подсчитана для трех образцов по результатам 24 определений в одном круге анализов для точности внутри серии. Для определения точности между сериями были рассчитаны результаты 5 различных серий анализов с 6 определениями каждого:

Внутри серии

Образец No	Среднее [нг/мл]	КВ [%]
1	33	1,9
2	93	2,4
3	227	3,2

Между сериями

Образец No	Среднее [нг/мл]	CV [%]
1	31	1,7
2	88	1,7
3	212	1,1

15.8 Интерферирующие вещества

Не влияет гемолизированная (до 1000 мг/дл), липемическая (до 3 г/дл триглицеридов) сыворотка или сыворотка, содержащая билирубин (до 40 мг/дл). Не было обнаружено влияние при использовании антикоагулянтов. Но рекомендуется не использовать сильно гемолизированную или липемическую сыворотку.

16. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор не является сам по себе диагностическим, но он используется в диагностических целях. Определение клинического диагноза не должно основываться на результатах одного теста и должно учитывать все данные клинических и лабораторных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «**ДИАМЕБ**»

ООО «**БиоТехЛаб-С**»

ул. Чорновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 612

e-mail: www.diameb.ua

www.biotechlab-s.com.ua