

НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТИРЕОГЛОБУЛІНУ

ORG 5TG, Thyroglobulin

Каталог. №: **ORG 5TG**

Методика від **08-2012**

Кількість : **96**

Виробник : **ORGENTEC GmbH,**
(Німеччина)



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

ПРИЗНАЧЕННЯ

Справжній набір використовує принцип непрямого твердофазового ІФА - ELISA. Він розроблений для кількісного виміру тиреоглобуліну в зразках людської сироватки або плазми. Набір призначений для діагностики різних тиреоїдних захворювань, таких як тиреоїдити і гіпертиреозидизм.

КЛІНІЧНА ЗНАЧИМІСТЬ (Див. оригінал інструкції).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікролульки покриті високоспецифічними антилюдськими антитілами до тиреоглобуліну. У ході аналізу тиреоглобулін зразків зв'язується з антитілами, сорбованими в лунках. Незв'язані компоненти видаляються наступним промиванням. Кон'югат антитіла до людського тиреоглобуліну-пероксидаза хрому утворює імунний комплекс антитіла/тиреоглобулін/кон'югат. Незв'язаний ферментний кон'югат видаляється розчином для промивання. Хромогенний субстратний розчин, що містить ТМБ, у присутності ферментного комплексу гідролізується, фарбуючи розчин в блакитний колір. Розвиток забарвлення зупиняється додаванням 1 М соляної кислоти як стоп-розчину. Розчин змінює колір на жовтий. Інтенсивність забарвлення вимірюється фотометрично при 450 нм. Оптична щільність прямо пропорційна концентрації тиреоглобуліну у зразку.

ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Всі реагенти набору призначені строго для діагностики *in vitro*.
2. Не змішуйте компоненти наборів з різних лотів.
3. Компоненти набору містять матеріали людського походження, які протестовані методами, схваленими FDA, на відсутність антитіл до гепатиту В і ВІЛ. Однак, жоден метод не може гарантувати, що продукти людського походження не інфіковані. Отже, з реагентами і зразками сироватки слід поводитися як з потенційно інфекційно небезпечними.
4. Уникайте контакту з ТМБ (3,3', 5,5' - тетраметилбензидином). Якщо ТМБ потрапив на шкіру, ретельно вимийте водою з милом.
5. Стоп розчин містить соляну кислоту. Якщо розчин потрапив на шкіру, ретельно промийте водою і зверніться до лікаря.
6. Деякі компоненти набору (напр. Контролі, буфер зразків і буферний миючий розчин) містять азид натрію в якості консерванту. Азид натрію є високо токсичним і реактивним в чистій формі. При концентрації в продукті тим не менш не небезпечний. Всупереч класифікації як безпечний, ми настійно рекомендуємо використовувати звичайні правила безпеки.
7. Деякі набори містять Проклін 300 в якості консерванту. При знищенні реагентів, що містять Проклін 300, промийте великою кількістю води для розбавлення компонентів до нижче активного рівня.
8. Використовуйте рукавички при роботі зі зразками та реагентами і ретельно мийте руки після роботи.
9. Не піпетувати ротом.
10. Не їжте, не пийте, не паліть або не застосовуйте косметику в місцях роботи із зразками або реагентами набору.
11. Не допускайте контакту між буферним розчином перекису і матеріалами, що легко окислюються: підвищена температура може викликати спонтанне загоряння.

Дотримуватися встановлених правил для проведення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контролів та/або об'єднаної сироватки. При роботі з усіма реагентами, контролями та зразками сироватки дотримуватися існуючих правових норм.

МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАВЛЯЮТЬСЯ

1. Мікропланшет, що складається з 12 смужок по 8 лунок кожен, покритих високоспецифічними антитілами до тиреоглобуліну людини (кролячими, поліклональними). Готовий для використання. - **1 планшет**.
2. Калібратори тиреоглобуліну в PBS/BSA буфері або сироватці, що містять 0; 3; 10; 30; 100 і 300 нг/мл (ФСБ, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{V/o})$). Готові для використання - **6 флаконів, 1,5 мл кожен**.
3. Контролі тиреоглобуліну в PBS/BSA буфері або сироватці (ФСБ, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{V/o})$), жовтий, (нормальний і завищений), див. вкладиш зі значеннями - **2 флакона, 1,5 мл кожен**. Готові до використання.
4. Контроль тиреоглобуліну на виділення (ФСБ, БСА, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{V/o})$), містить 50 нг/мл людського тиреоглобуліну. Готовий для використання - **1 флакон, 3 мл**.
5. Буфер зразків, жовтий, готовий до використання (Трис, $\text{NaN}_3 < 0,1\%(\text{V/o})$) - **1 флакон, 15 мл**.
6. Розчин ферментного кон'югата (блідо-червоний), що містить поліклональні кролячі антитіла до людського тиреоглобуліну, мічені пероксидазою хрому (ФСБ, Проклін 300 $< 0,5\%(\text{o/o})$). Готовий для використання. - **1 флакон, 15 мл**. Готовий до використання.
7. Розчин субстрату ТМБ - **1 флакон, 15 мл**. Готовий до використання.
8. Стоп розчин (містить кислоту) - **1 флакон, 15 мл**. Готовий до використання.
9. Буферний розчин для промивання, **концентрат (50X) - 1 флакон, 20 мл**.

ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ РЕАГЕНТІВ

1. Зберігайте набір при 2-8 °С.
2. Містить ячейки мікропланшетів, запечатані в сухому пакеті з осушувачем.
3. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності.
4. Не піддавайте реагенти впливу спеки, сонця або сильного світла під час зберігання чи використання.
5. Розбавлений миючий буфер стабільний 30 днів при зберіганні при 2-8 °С.

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

Обладнання

- Мікропланшетний рідер з довжиною хвилі вимірювання 450 нм
- Багатоканалний диспенсер
- Вортекс
- Піпетки на 50, 100 та 1000 мкл
- Лабораторний годинниковий пристрій
- Програмне забезпечення

Приготування реагентів

- Дистильована вода
- Мірний циліндр на 1000 мл
- Пластиковий контейнер для зберігання промивного розчину

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

Матеріал зразка: сироватка або плазма

Обсяг зразка: 50 мкл для одинарного визначення

Загальний час інкубації: 135 хвилин при кімнатній температурі (18-28 °С)

Діапазон калібрування: 3-300 нг/мл

Чутливість: 1 нг/мл

Зберігання: охолодження при 2-8 °С

Термін придатності: 12 місяців з моменту виготовлення або до зазначеного на етикетках терміну придатності

Формат набору: 96 тестів

ЗБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

1. Зберіть кров звичайною венепункциєю, уникаючи гемолізу.
2. Дозвольте крові згорнутися і відокремте сироватку від клітин центрифугуванням після утворення згустку.
3. Сироватка не повинна містити ніяких домішок або бути гемолізованою. Краще уникати гемолізу і ліпемії, хоча вони не роблять істотного впливу на цей аналіз.
4. Зразки можуть зберігатися охолодженими до 2-8 °С принаймні 5 діб. Для більш тривалого зберігання до шести місяців зразки слід заморозити до -20 °С.
5. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання зразків, так як це може призвести до втрати активності.
6. Використання інактивованих теплом сироваток не рекомендується.

ПРОЦЕДУРНІ ЗАУВАЖЕННЯ

1. Не використовуйте компоненти набору після закінчення терміну придатності.
2. Не міняйте компоненти набору між різними лотами.
3. Всі матеріали слід привести до кімнатної температури.

- Всі реагенти при початку аналізу повинні бути готові до роботи. Після початку аналіз необхідно проводити безперервно для отримання надійних і точних результатів.
- Проводьте всі кроки аналізу в зазначеному порядку.
- Завжди використовуйте свіжу розбавлену сироватку.
- Піпетувати всі реагенти та зразки на дно лунок.
- Для запобігання забрудненню мийте наконечники між зразками і різними контролями набору.
- Дуже важливо промивати лунки ретельно і видаляти повністю всю рідину для отримання оптимальних результатів.
- Всі кроки інкубації повинні проводитися на протязі визначеного часу.
- Контрольна сироватка повинна аналізуватися як невідома для перевірки реагентів і аналізу.
- Не використовуйте повторно лунки мікропланшета.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Приготування буферного промивного розчину

Розбавте вміст флакона з 50-кратним концентратом промивального буфера дистильованою водою до кінцевого об'єму 1000 мл (20 мл концентрату і 980 мл води) перед використанням. Зберігайте охолодженим до 2-8 °C принаймні 30 днів після приготування або до вказаного для набору терміну придатності.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ. ТЕСТ НА ВИДІЛЕННЯ

Присутність антитіл до тиреоглобуліну може заважати визначенню тиреоглобуліну в сироватці. На поверхні молекули тиреоглобуліна є шість імуногенних епітопів, з якими можуть зв'язуватися антитіла з різними характеристиками зв'язування. Аутоантитіла до цих епітопів будуть причиною хибно негативних результатів, пов'язуючи ендogenous тиреоглобулін. Отже, необхідно довести присутність аутоантитіл у зразках пацієнтів. Це може бути зроблено або прямим кількісним виміром антитіл до тиреоглобуліну або непрямим тестом на виділення в поєднанні з кількісним визначенням тиреоглобуліну. У цьому тесті до зразка пацієнта додається екзогенний тиреоглобулін з певною концентрацією. Виділення екзогенного тиреоглобуліну може бути розраховане і може служити доказом наявності аутоантитіл. Вимірювання дає кореляцію величин вилучення з концентрацією присутніх антитіл. Для тесту на виділення зразки слід вимірювати двічі - пряме вимірювання і зразок з доданим тиреоглобуліном (Тгл). Відсоток вилучення (% вил.) розраховується за формулою, наведеною нижче:

$$\% \text{ вил.} = \frac{\text{нг/мл Тгл (с К извл.)}}{\text{нг/мл Тгл (без К извл.)} + 50 \text{ нг/мл}} \times 100$$

зауваження: К извл. - Контроль на виділення, він містить 50 нг/мл тиреоглобуліну людини.

Очікуваний діапазон виділення 80-120%. Якщо відсоток вилучення тиреоглобуліну вище або нижче цих значень, значення тиреоглобуліну відповідного пацієнта для подальшої оцінки повинні бути виключені.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Приготуйте достатню кількість смужок для постановки калібраторів, контролів і нерозведених проб пацієнтів (P) і проб для тестів на виділення (R) в дублях.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	SA	SE	P1	P3			SA – SF стандарти A - F					
b	SA	SE	P1	P3								
c	SB	SF	R1	R3			C1 и C2 – контроли отрицательный и положительный					
d	SB	SF	R1	R3								
e	SC	C1	P2	..			P1, P2 – образцы сывороток пациентов					
f	SC	C1	P2	..								
g	SD	C2	R2	..			R1, R2 – контроль извлечения образцов сывороток пациентов					
h	SD	C2	R2	..								

- Додайте в лунки **50 мкл** калібраторів, контролів і нерозбавлених зразків пацієнтів.
- Додайте **50 мкл буфера зразків** до стандартів, зразків і пацієнтів в лунки P1, P2... Додайте **50 мкл Контролю тиреоглобуліну** на виділення до зразків пацієнтів в лунки R1, R2...
- Інкубуйте 60 хвилин при КТ (20-28 °C).
- Видаліть вміст лунок і тричі промийте **300 мкл** розчину для промивання.
- Додайте **100 мкл** розчину ферментного кон'югата в кожну лунку.
- Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок і тричі промийте з **300 мкл** промивного розчину.
- Додайте **100 мкл** розчину субстрату ТМБ в кожну лунку.

- Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі.
- Додайте **100 мкл** стоп-розчину в кожну лунку і витримайте 5 хвилин.
- Зчитайте оптичну щільність при 450 нм і розрахуйте результати. Біхроматичне вимірювання проводьте при 600-690 нм. **Забарвлення, яке розвинулося, є стабільним протягом 30 хвилин. Зчитайте оптичну щільність за цей час.** Набір повністю придатний для використання в автоматичних імуноферментних аналізаторах відкритого типу.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Контроль якості

Тест достовірний за умови, що ОП контролів при 450 нм повністю відповідають діапазонам, зазначеним у сертифікаті контролю якості до набору, вкладеному в набір. Якщо умови не дотримуються, аналіз необхідно повторити.

Розрахунок результатів

Для даного набору рекомендується 4-параметрична регресія з лінійно-логіфімічними координатами для оптичної щільності і концентрації.

Спочатку розрахуйте середні оптичні щільності для кожного стандарту. Використовуйте лінійно-логіфімічний міліметровий папір і відкладіть оптичну щільність проти концентрації для кожного калібратора. Проведіть оптимальну калібрувальну криву, використовуючи всі точки. Концентрація невідомих зразків обчислюється інтерполяцією.

ПРИКЛАД РОЗРАХУНКУ

Цифри і графіки, показані нижче - типові результати, отримані на цьому наборі. Дані призначені тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для розрахунку результатів інших тестів.

Стандарти										
No Ст.	Ячейка	OD1	OD2	среднее	конц 1	конц 2	сп. конц	заявлен ная конц	CV %	
STA	A1/B1	0.065	0.062	0.063	0.4	0.2	0.3	0	4	
STB	C1/D1	0.117	0.111	0.114	2.8	2.5	2.6	3	4	
STC	E1/F1	0.221	0.209	0.215	10	9	10	10	4	
STD	G1/H1	0.421	0.451	0.436	29	32	31	30	5	
STE	A2/B2	0.930	0.933	0.932	102	102	102	100	0	
STF	C2/D2	1.759	1.780	1.769	298	304	301	300	1	

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В літературі повідомляється про значення cut-off для тиреоглобуліну в сироватці близько 60 нг/мл з медіаною від 5 до 10 нг/мл. У новонароджених і у вагітних 3-го триместру можуть спостерігатися високі значення тиреоглобуліну. Для правильної інтерпретації концентрації тиреоглобуліну необхідна інформація про йодозабезпеченість організму. У регіонах з ендемічним зобом рівні тиреоглобуліну вищі. Справжній набір дає значення тиреоглобуліну у здорових донорів від 2 до 50 нг/мл.

У пацієнтів з тотальною тироїдектомією після променевої терапії тиреоглобулін не повинен виявлятися. Будь-яке підвищення тиреоглобуліну до визначних величин означає рецидив продукції тиреоглобуліну в метастазах.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Лінійність

В експериментах по розбавленню зразків сироватки з високими концентраціями тиреоглобуліну були розбавлені буфером для зразків і проаналізовані. Результати показали лінійність у всьому вимірюваному діапазоні.

Відтворюваність

Статистика для коефіцієнтів кореляції (CV) була розрахована для кожного з трьох зразків у 24 визначеннях в одній постановці для оцінки відтворюваності всередині серії. Відтворюваність між серіями оцінювалася з результатів 5 різних аналізів по 6 визначень кожного зразка:

В середині аналізу		
Взірець №	Середнє [нг/мл]	CV [%]
1	33	1.9
2	93	2.4
3	227	3.2

Між аналізами		
Взірець №	Середнє [нг/мл]	CV [%]
1	31	1.7
2	88	1.7
3	212	1.1

Чутливість

Мінімальна межа, яка визначається, становить для тиреоглобуліну - 1,0 нг/мл.

Специфічність

Антисироватка (поліклональна, кроляча), використана для сорбції мікропланшету і в ферментному кон'югаті, є високоспецифічною до молекули людського тиреоглобуліну.

КАЛІБРУВАННЯ

Тест-система прокалібрована по Сертифікованому Референсному Матеріалу CRM 457 з BCR, Брюссель, для людського тиреоглобуліну.

Обмеження процедури

Даний набір є діагностичним. Визначення клінічного діагнозу не повинно ґрунтуватися на результатах одного тесту і має враховувати всі дані клінічних та лабораторних досліджень.

Інтерференція

Не спостерігалися перехресні реакції в наступних умовах: сироватка з гемолізом до 1000 мг/дл, ліпемії до 3 г/дл тригліцеридів, білірубін до 4 мг/дл. Не спостерігалися ніякі інтерферуючі впливи антикоагулянтів. Однак, з практичних причин не рекомендується використання гемолізованих або ліпемічних зразків.

СХЕМА ІНКУБАЦІЇ (Див. оригінал інструкції).

**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

