



Набор ИФА для определения АНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ

Кат. № : EIA-4110
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

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

Методика от 29-10-2009

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

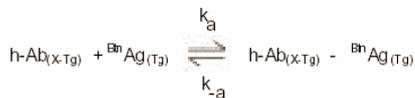
Предназначение

Для количественного определения антител к тиреоглобулину (Тг) в человеческой сыворотке или плазме методом микропланшетного иммуноферментного анализа. Измерения антител к Тг может послужить средством диагностики определенных тиреоидных болезней как Гашимото и Грейвса, а также нетоксического зоба.

Принцип

Необходимы реагенты для последовательного ИФА 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 добавленного 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 «сэндвич-комплекс». Взаимодействие показано на следующей схеме:



$\text{BnAg}_{(Tg)}$ = биотинилированный антиген (постоянное количество)
 $h\text{-Ab}_{(x\text{-Tg})}$ = человеческое аутоантитело (переменное количество)
 $\text{Ab}_{(x\text{-Tg})} - \text{BnAg}_{(Tg)}$ = иммунный комплекс (переменное количество)
 k_a = степень константы ассоциации
 k_{-a} = степень константы диссоциации

Одновременно комплекс осаждается на лунке путем реакции высокой сродности между стрептавидином и биотинилированным антигеном. Это взаимодействие изображено следующим образом:

$h\text{-Ab}_{(x\text{-Tg})} - \text{BnAg}_{(Tg)} + \text{Streptavidin}_{C.W.} \rightarrow$ иммобилизованный комплекс (ИК)

$\text{Streptavidin}_{C.W.}$ = стрептавидин, иммобилизованный на лунке
Immobilized complex: сэндвич комплекс, связанный с твердой поверхностью.

После инкубационного периода лунка промывается для ее отделения от несвязавшихся антигенов декантацией или аспирацией. Ферментосвязуемое видоспецифическое антитело (anti-h-IgG, M или A) последовательно добавляется к микролунам. Это подводит связи к создаваемому иммунному комплексу.

$\text{IC}_{(h\text{-IgG})} + \text{ENZAb}_{(x\text{-h-IgG})} \rightarrow \text{ENZAb}_{(x\text{-h-IgG})} - \text{IC}_{(h\text{-IgG})}$

$\text{IC}_{(h\text{-IgG})}$ = иммобилизованный иммунный комплекс (переменное количество)

$\text{ENZAb}_{(x\text{-h-IgG})}$ = фермент-антитело соединение (стабильное количество)

$\text{ENZAb}_{(x\text{-h-IgG})} \rightarrow \text{IC}_{(h\text{-IgG})} - \text{Ab}_{(h\text{-IgG})} = \text{Ag-Ab}$ комплекс (переменное количество)

Anti-h-IgG ферментный конъюгат, связанный с иммунным комплексом, во второй инкубации отделяется промывкой от невступившего в реакцию материала. Ферментная активность в этой фракции прямо пропорциональна к концентрации антитела в образце. Путем анализа нескольких образцов сывороток при известной активности антител, можно вывести кривую, из которой определяется неизвестная активность антител.

Реагенты

Материалы, поставляемые с набором:

A. Калибраторы анти-Тг – 1мл/флакон.

Шесть (6) флаконов с референс-растворами анти-Тг на уровне 0 (A); 50 (B); 125 (C); 500 (D); 1000 (E) и 2000 (F) МЕ/мл. Консервант добавлен. Хранить при 2 – 8°C.

Примечание: калибраторы сделаны из сыворотки человека.

B. Биотиновый реагент анти-Тг – 13 мл/флакон.

Один (1) флакон, биотинилированного тиреоглобулина в буферной основе. Добавлен консервант. Хранить при 2 – 8°C.

C. Ферментно-антигенный реагент – 13 мл/флакон.

Один (1) флакон конъюгата человеческих антител IgG с пероксидазой хрена в буферной основе. Консервант добавлен. Хранить при 2 – 8°C.

D. Микропланшет, покрытый стрептавидином – 96 лунок.

Один (1) 96-луночный микропланшет, покрытый стрептавидином и упакованный в пакетик из фольги с поглотителем влаги. Хранить при 2 – 8°C.

E. Разбавитель сыворотки – 20 мл.

Один (1) флакон растворителя сыворотки с соевым буфером и красителем. Хранить при 2 – 8°C.

F. Концентрат промывочного раствора – 20 мл.

Один (1) флакон с поверхностно-активным веществом (ПАВ) в соевом буфере. Консервант добавлен. Хранить при 2 – 30°C.

G. Субстрат А – 7 мл/флакон.

Одна (1) бутылочка с тетраметилбензидином в буфере. Хранить при 2 – 8°C.

H. Субстрат Б – 7 мл/флакон.

Одна (1) бутылочка с перекисью водорода (H₂O₂) в буфере. Хранить при 2 – 8°C.

I. Стоп-раствор – 8 мл/флакон.

Одна (1) бутылочка с концентрированной кислотой (1N HCl). Хранить при 2 – 8°C.

J. Инструкция по применению продукта

Примечание 1: Не использовать реагенты по истечении срока годности.

Примечание 2: Открытые реагенты стабильны в течение 60 дней при температуре хранения 2 – 8°C.

Примечание 3: Реагенты предназначены для использования в микропланшете на 96 лунок.

Материалы, необходимые, но НЕ поставляемые в наборе

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 длинной 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. Пробирки для разведения образцов.
9. Таймер.
10. Материалы контроля качества.

Меры предосторожности

Для использования в диагностике *in vitro*.

Не для наружного или внутреннего использования людьми и животными.

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 подготовка образцов

Образцы – это кровь, сыворотка или плазма крови; при их отборе через вену должны строго соблюдаться все правила данного метода. Для достижения более точных и четких результатов кровь необходимо отобрать натощак с утра. Дайте крови свернуться. Отцентрифугируйте её для получения сыворотки. Образцы могут быть заморожены при 2 – 8°C максимум на 5 дней. Если образцы не могут быть рассмотрены в течение данного периода времени, их следует заморозить до – 20°C на срок до 30 дней. Избегайте

повторного замораживания и размораживания. Когда анализ проводится в дубликаты, берется по 0,100 мл разведенного образца.

Подготовка реагентов

1. Разбавитель сыворотки

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

2. Промывочный буфер

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

3. Рабочий раствор субстрата

Определите количество необходимого реагента и приготовьте смешиваниям в равных пропорциях субстрата А и субстрата В в подходящем контейнере. Смешайте и храните при 2-8°C. 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

Внесите по 0,010 (10 мкл) каждого образца пациента в 1 мл разбавителя сыворотки. Накройте и тщательно перемешайте на вортексе путем переворачивания. Храните при 2-8°C до 48 часов.

Процедура анализа

Перед началом анализа привести все реагенты, референтные сыворотки и контроли к комнатной температуре (20 - 27°C).

- Расположить лунки микропланшета для каждой референтной сыворотки, контроля или разбавленного образца пациента для исследования в двойном экземпляре. **Поместить неиспользуемые стрипы обратно в пакет из фольги. Герметично закрыть и хранить запечатанным при 2 - 8°C.**
- Раскапать по 0,050 мл соответственной референс-сыворотки, контроля и разбавленного образца пациента в соответствующие лунки.
- Добавить по 0,100 мл раствора биотинилированного конъюгата Тг.
- Покачать аккуратно планшет в течение 20 - 30 секунд чтобы перемешать и накрыть.
- Инкубировать 60 минут при комнатной температуре.
- Удалить содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. При декантации протереть планшет насухо промокающей бумагой.
- Добавить по 300 мкл промывочного буфера (см. Подготовка Реагента) и снова подвергнуть декантации или аспирации. Повторить вышеупомянутую процедуру 2 раза (в сумме 3 промывки). Для этих целей может использоваться автоматический вошер. При использовании гибкой бутылки, заполните каждую лунку под давлением (не допуская возникновения пупырешек) для проведения промывки. Декантировать и повторить дополнительно два (2) раза.
- Добавить по 0,100 мл ферментного anti-h-IgG, IgM или IgA раствора конъюгата во все лунки. **Всегда добавлять реагенты в одинаковой последовательности для минимизирования времени реакции между лунками. Не встряхивать планшет после добавления фермента.**
- Накрыть и инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
- Повторить последовательность (см. п. 6 и 7) как указано выше.
- Добавить по 0,100 мл раствора рабочего субстрата во все лунки. **Всегда добавлять реагенты в одинаковой последовательности для минимизирования времени реакции между лунками. Не встряхивать планшет после добавления фермента.**
- Инкубировать при комнатной температуре в течение 15 минут.
- Добавить по 0,050 мл стоп-раствора в каждую лунку и аккуратно перемешать 15-20 секунд. Всегда добавлять реагенты в одинаковой последовательности для минимизирования времени реакции между лунками.
- Считать поглощение в каждой лунке при 450 нм. Результаты должны быть получены в течение 30 минут с момента добавления стоп-раствора.

Примечание: При проведении анализа образцов с концентрацией больше чем 2000 МЕ/мл, растворите образец в пропорции 1:5 или 1:10 используя первичный растворяемый материал в сыворотке. Умножьте соответственно к пропорции для получения концентрации образца.

Расчет результатов

Для исследования концентрации Anti-Tg в неизвестном образце строится референтная кривая.

- Запишите поглощение, полученное в результате анализа на микропланшетном ридере как указано в примере 1.
- На линейной графопостроительной бумаге выведите абсорбцию для каждого дубликата референс-сыворотки против соответствующей активности анти-Тг в МЕ/мл.
- Нарисуйте наиболее подходящую кривую по этим точкам.
- Для определения уровня неизвестной активности Anti-Tg изобразите среднее значение неизвестного поглощения дубликата на вертикальной оси графика; найдите точку пересечения на кривой и получите концентрацию (в МЕ/мл) с горизонтальной оси графика (среднее число неизвестных дубликатов можно выводить по изображенному). В последующем примере среднее поглощение составляет 1,387 (количество пересечений в кривой) при концентрации Anti-Tg 790 МЕ/мл (См. Рисунок 1).

Образец	Номер ячейки	Абс (А)	Среднее Абс. (В)	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		

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

Параметры контроля качества

Для достоверности результатов, следующие критерии должны выполняться:

- Абсорбция (ОП) калибратора "F" должна быть $\geq 1,3$.
- Четыре из шести объединений контроля качества должны соответствовать установленному диапазону.
-

Контроль качества

Каждая лаборатория должна использовать во время анализа контроля низкого, нормального и высокого уровня для отслеживания качества процедуры. Эти контроли должны использоваться как неизвестные и значения должны получаться свои для каждого анализа. Значения контролей качества должны быть получены вместе с реагентами набора. Для уверенности должны использоваться соответствующие статистические методы. Каждая лаборатория должна иметь свои специфические условия проведения анализа. Значительное отклонение от полученных данных говорит о незаметных изменениях в экспериментальных условиях или разложении компонентов набора. Свежие реагенты используются для определения необходимости для вариаций.

Ограничения процедуры

А. Рабочие характеристики

- 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.

В. 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 МЕ/мл. Клиническая важность результата, вместе с активностью анти – тироидной пероксидазы, должны использоваться для оценки тироидного 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-тироидной пероксидазы (ТРО). Широко используемая практика проведения обоих тестов была оспорена.

биологические образцы от здоровых и больных пациентов. Болезни: тиреодит Гашимото, болезнь Грейвса, наросты щитовидной железы, рак щитовидной железы. Общее количество образцов составляло 82. Для анти-тиреоглобулина Эллиса было вычислено коэффициент корреляции и наименьшее квадратное регрессии в сравнении с данным методом. Данные находятся в Таблице 4

Таблица 4

Метод	Среднее (x)	Анализ наименьшей квадратической регрессии	Коэффициент корреляции
Данный метод	415,6	$y = 9,79 + 0,969(x)$	0,995
Референтный	419,2		

Только некоторые расхождения настоящего набора и референтного метода указывают на близость средних значений. Наименьшее квадратическое уравнение регрессии и коэффициент корреляции указывает на отличное совпадение метода.

С. Чувствительность

Чувствительность настоящего набора составляет 5 МЕ/мл.

Д. Специфичность

Реактивность с антиядерными антителами, ДНК, тиреодной пероксидазой и ревматоидными антителами в данном анализе оказалась незначительной.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

Ожидаемые диапазоны значений

Изучение обычной популяции проводилось для определения ожидаемых значений для микропланшетной системы исследования анти-Тг. Количество (n), среднее значение (x) и стандартное отклонение (σ) даны в таблице 1. Значения до 125 МЕ/мл считаются положительными на антител аутоантител к анти-Тг.

Таблица 1

Ожидаемые значения системы исследования анти-ТГ методом ИФА (в МЕ/мл)

Количество (n)	100
Среднее (x)	74,3
Стандартное отклонение (σ)	25,2
Верхний уровень 95% (+2σ)	124,7

Важно помнить, что установление граничных значений, которые можно получит 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.

Рабочие характеристики

А. Точность

Точность внутри и между анализами 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

Точность в пределах анализа (значения в МЕ/мл)

Образец	Число	Ср. знач.	Ст. отклон.	К.В. %
Пул 1	20	65,5	3,3	5,0
Пул 2	20	385,5	15,5	4,0
Пул 3	20	1554,4	55,4	3,6

Таблица 3

Точность между анализами (значения в МЕ/мл)

Образец	Число	Ср. знач.	Ст. отклон.	К. В. %
Пул 1	10	66,8	3,6	5,3
Пул 2	10	374,2	18,5	4,9
Пул 3	10	1625,5	65,2	4,0

Как было измерено в 10 экспериментах в дубли.

В. Точность

Микропланшет анти-тиреоглобулина DRG был сравнен с похожим микропланшетом ИФА анти-тиреоглобулина. Использовались

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua