



Набор для определения антител к ТИРЕОГЛОБУЛИНУ TgAb

Кат. № : 101-KT26IW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

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

Методика проверена 05-2004

НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ является непрямым твердо фазовым иммуноферментным анализом для количественного измерения анти-тиреоглобулиновых антител (TgAb) в человеческой сыворотке или плазме.

1. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

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

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

- гипертиреоз
- нетоксический зоб
- тиреоидиты
- тиреоидная карцинома.

Определение тиреоглобулина – специальный прогностический инструмент у пациентов, леченных по поводу болезни Грейвса. Высокие уровни тиреоглобулина в конце тиреостатической 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 тиреоидной карциномой. После тиреоид-эктомии, комбинированной с лучевой терапией для разрушения оставшихся тиреоидных тканей можно ожидать промежуточный пик вслед за быстрым уменьшением концентрации циркулирующего тиреоглобулина ниже предела детектирования тиреоглобулина. Каждое новое повышение тиреоглобулина в сыворотке свидетельствует о остаточных тиреоидных тканях, локальном рецидиве метастаз.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Высоко очищенная анти-человеческие-тиреоглобулин антитела привиты к микрочайкам. Тиреоглобулин, если присутствуют в разбавленной сыворотке, связываются с микрочайками. Промывание микрочайек удаляет

101-KT26IW, Anti-Thyroglobulin

несвязанные антитела сыворотки. Анти-человеческие тиреоглобулин конъюгированные пероксидазой хрена иммунологически связываются с связанным тиреоглобулином пациента, формируя антитело-конъюгат--тиреоглобулин комплекс. Промывание микрочайек 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. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 1 месяца.

3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

1. **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок с покрытым человеческим тиреоглобулином. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой сумке, тщательно закрытым.
1. **Калибраторы: 6 флаконов (2 мл) TgAb** в предварительно разбавленной человеческой сыворотке в следующих концентрациях: 0, 50, 150, 500, 1500 и 5000 МЕ/мл. Готовы к использованию. Консервант: NaN₃ (<0.1%).
2. **Ферментный конъюгат: 1 флакон (15 мл)** анти-человеческого IgG, конъюгированного с HRPO, в Tris буфере, содержащим BSA и стабилизаторы. Консервант: неомидин. Готов к использованию.
3. **Контрольная сыворотка: 2 флакона (2 мл)** предварительно разбавленной человеческой сыворотки. Готова к использованию. Консервант: NaN₃ (<0.1%).
4. **Разбавитель образца (концентрированный): 1 флакон (15 мл)** фосфатного буфера с BSA. Разбавить содержимое флакона 150 мл дистиллированной воды. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Разбавленный разбавитель стабилен в течении 30 дней при 2-8°C.

3.2 ОБЩИЕ РЕАГЕНТЫ:

1. **Промывочный раствор (концентрат): 1 флакон (50 мл)** фосфатного буфера с детергентом. Консервант: тимеросал (<0.1%). Разбавить содержимое флакона 500 мл дистиллированной воды. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 30 дней при 2-8°C.
2. **Хромоген: 1 флакон (15 мл)** ТМВ с цитрат-фосфатным буфером и DMSO.
3. **Субстратный буфер: 1 флакон (15 мл)** цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂.

Примечание: Чтобы получить раствор субстрата, смешайте одинаковое количество хромогена и субстратным буфером, используйте темный и чистый флакон. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течение 1 часа со времени приготовления.

4. **Стоп раствор: 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄.** Готов к использованию.
5. **Самоклеющиеся крышки для планшета**
6. **Полиэтиленовая сумка с зажимом.**

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Регулируемые автоматические микропипетки со сменными насадками.
2. Тестовая пробирка.

3. Термостатный микропланшетный шейкер, отрегулирован на 37±2°C и 1200 об./мин.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Микропланшетный фотометр с фильтром 450, 405 и 620 нм (диапазон 0-3,0 ОП).
6. Дистиллированная вода.

5. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- 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.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий 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 не-опасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности.
- 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.
- Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови, сыворотки или плазмы 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 °C на протяжении максимум 1-2 дней. Если образцы не использованы на протяжении этого времени, их можно хранить при температуре -20 °C до 30 дней. Избегайте повторных замораживаний и размораживаний.

Разбавление образца

Перед анализом разбавьте образцы 1:101 следующим образом: **10 мкл образца + 1000 мкл разбавителя.**

Стандарты и контрольные сыворотки уже разбавлены и готовы к использованию.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- приведите все реагенты к комнатной температуре.

- переворачивая образец, смешайте его перед использованием.

1. Приготовьте лунки для бланка, калибраторов, контрольной сыворотки и разбавленного образца в соответствующие лунки единственном количестве для и образцов.
2. Распределите **100 мкл** каждого из калибраторов, контрольной сыворотки и разбавленного образца в соответствующие лунки. Распределите непосредственно по дне каждой лунки.
3. Инкубируйте в течении **60 минут при 37°C**.
4. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию жидкости из лунок кроме бланка.
5. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую ячейку кроме бланка.
6. Встряхивайте лунки **30 мин.** при температуре 37°C.
7. Промойте лунки как описано в п 4.
8. Внесите **100 мкл** раствора хромоген-субстрата во все лунки.
9. Встряхивайте лунки **15 мин.** при температуре 37°C. Избегайте попадания прямого солнечного света.
10. Добавьте **100 мкл** стоп раствора во все лунки.
11. Считайте ОП бихроматичным фотометром при 450 нм с контрольной длиной волны 620 нм в течении **20 минут** после завершения анализа.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 24 в оригинале инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения большей чувствительности существующий метод включает спектрофотометрическое считывание при двух длинах волн (450 и 405 нм). Для образцов с TgAb от 0 до 500 МЕ/мл считайте при 450 нм, для образцов с TgAb более чем 500 VE/мл, считывайте при 405 нм. Нарисуйте калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибратора (ось x) напротив абсорбции для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации TgAb в МЕ/мл получаются путем интерполяции абсорбций каждого образца на калибровочной кривой.

9.1 ПРИМЕР ВЫЧИСЛЕНИЯ

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные (см. таблицу на стр. 18 в оригинале инструкции).

9.2 Приемлемый диапазон

Бланк	< 0.100 ОП
Контрольная сыворотка 1 (отриц.)	< 100 МЕ/мл
Контрольная сыворотка 2 (полож.)	См. вложенную карточку контроля качества

9.3 Интерпретация результатов

Нормальные значения определены на 300 образцах и зависят от разных факторов. Рекомендуется установление нормального диапазона каждой лабораторией отдельно.

Нормальные значения для TgAb	< 100 МЕ/мл
Граничные значения для TgAb	100 - 120 МЕ/мл
Повышенные значения для TgAb	> 120 МЕ/мл

10. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА

10.1 Специфичность

Не была обнаружена перекрестная реактивность с анти-ТРО аутоантителами в человеческой сыворотке.

10.2 Чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе. Значительно отличающуюся от нулевого калибратора (средн. значение + 2 CO – стандартное отклонение). **Эта доза составляет 3.7 МЕ/мл.**

10.3 Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения КВ% (коэффициент вариации) 4 и 3 сывороток при разных концентрациях TgAb.

Повторяемость (внутри анализа)

4 сыворотки анализированы в 10 репликациях.

Сыворотка	Средн. (Е/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
A	77.9	7.1	9,2	10
B	266	20.9	7.8	10
C	495	37.5	7.6	10
D	3280	218.2	6.7	10

Воспроизводимость (между анализами)

2 репликации каждой сыворотки анализируются в разных отдельных анализах.

Сыворотка	Средн. (Е/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
A	90,4	9,6	10,6	10
B	253,8	15,1	5,9	12
C	487	32	6,6	12

10.4 Тщательность

Проверена при использовании параллельных анализов.

Параллельный анализ

Нулевым калибратором проанализированы 2 сыворотки с разными концентрациями TgAb и при разном разбавлении:

Разбавление	Ожидаемое значение (МЕ/мл)	Полученные данные (МЕ/мл)	Восстановл. (%)
S1 неразбавл.	-	224	-
1/2	112	104	92,8
1/4	56	55	98,2
1/8	28	33	117,9
1/16	14	20	142,9
S2 неразбавл.	-	479	-
1/2	240	226	94,2
1/4	120	126	105
1/8	60	67	111,6
1/16	30	36	120

Примечание: по причине гетерогенности аутоантител, могут поводиться нелинейные разбавление некоторых образцов пациентов.

11. ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

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

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Черновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: (0342) 77 51 22;
тел./факс: (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.com