



Анти-тироглобулин (Anti – Tg) ELISA

Приложение:
За количествено определяне на автоантитела на тироглобулин (Tg) в човешки серум чрез ензимен имуноанализ. Измерването на автоантителата на Tg се прилага при диагностиката на някои тироидни заболявания, напр. Болестите на Хашимото и Грейвс както и за нетоксични образувания в същата област.

Резюме и описание на анализа:

Установено е, че наличието на антитела на тироглобулин е характерно за пациенти с тироидит и първични тиротоксикози. Поради това клиничното измерване дава ценна информация за диагностиката на тироидната дисфункция. Пасивните методи за измерване на хемаглютинацията (РНА) в миналото даваха такава информация, но тези методи не са така чувствителни както имуноаналитичните и са ограничени поради възможно субективно интерпретиране. Тази процедура осигурява възможност за проследяване на антителата на Tg на субклинично ниво и елиминира субективното интерпретиране.

Методът на Fortress's осигурява максимална чувствителност чрез извършването само на няколко манипулации. При този метод разрежданият спесимен или контролата първо се накапват на микроплаката, добавя се тироглобулин Tg и след това те се смесват. Реакцията се провежда при смесването на антителата на Tg и биотинирания Tg до образуването на имунен комплекс, който се нанася на повърхността на кладенчетата със стрептавидин посредством високо-афинитетна реакция между биотин и стрептавидин.

Остатъчните количества от реактантите се отделят от реакционната повърхност след приключването на инкубацията. След това се добавя ензимен анти-човешки IgG конюгат, който способства за

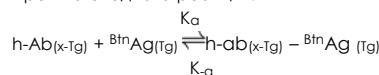
количественото измерване чрез реакция с човешкия IgG от имунния комплекс. След измиването се ензимната активност се определя чрез реакция със субстрата до получаването на оцветяване. Използването на няколко серумни референта с позната активност разрешава начертането на крива на активността на ензима и на антителата. Ензимната активност на неизследваните спесимени може да бъде свързана с нивото на аутоимунните антитела чрез сравняването на кривата с тази след прилагането на лечение.

Принцип на теста:

Секвениран Elisa метод (тип 1):

Реагентите необходими за секвенирания ELISA анализ включват имобилизиран антиген, циркулиращо антитяло и ензимно свързано специфично антитяло. При тази процедура имобилизирането се извършва по време анализа на повърхността на кладенчето на микроплаката чрез натоварения стрептавидин и добавения антиген на биотинид тироид пероксидаза. При смесването на биотинилираното антитяло със серум, съдържащ автоантитела се провежда реакция между антигена и антитялото при която се образува имунен комплекс.

Протича следната реакция:



$B^{tn}Ag(Tg)$ = биотинилиран антиген (постоянно количество)

$h-Ab(x-Tg)$ = човешко авто-антитяло (променливо количество)

$Ab(x-Tg)-B^{tn}Ag(Tg)$ = имунен комплекс (променливо количество)

K_a = стойност на константното асоцииране

K_d = стойност на константното неасоцииране

През това време комплекса се нанася върху ямката чрез високо-афинитетна реакция на стрептавидина с биотинилираното антитяло.

Тази реакция протича така:

$h-Ab(x-Tg) - B^{tn}Ag(Tg) + Streptavidin C.W \Rightarrow$ имобилизиран комплекс (IC) $Streptavidin C.W =$ имобилизиран стрептавидин в ямката. Имобилизиран комплекс (IC) = сандвич комплекс върху твърдата повърхност. След съответното инкубиране кладенчето се измива за отстраняване на излишните компоненти. Ензимно свързаното антитяло (anti-h-IgG) след това се добавя към кладенчетата. Тези конюгати се свързват с образувания имунен комплекс.

$I.C. (h-IgG) + ENZ Ab (x-h-IgG) \Rightarrow ENZ Ab (x-h-IgG)-I.C. (h-IgG)$
 $I.C. (h-IgG) =$ имобилизиран имунен комплекс (променливо количество)
 $ENZ Ab (x-h-IgG) =$ конюгат ензим-антитяло (постоянно количество)
 $ENZ Ab (x-h-IgG) - I.C. (h-IgG) = Ag - Ab$ комплекс (променливо количество)

Ензимният конюгат anti-h-IgG който се свързва с имунния комплекс при второто инкубиране се отделя от не-свързания с реакцията материал чрез измиване.

Ензимната активност на тази фракция е пропорционална на концентрацията на антитялото в спесимена. Чрез използването на различни серумни с известна концентрация на антиге може да се начертает крива от която да се определи концентрацията на неизвестния антиген.

Включени реагенти:

Съхранение на 2-8°C

Anti -Tg компоненти;	обем
Anti-Tg калибратор 6 нива	6 x1ml
Thyroglobuline Biotin reagent.	1x13ml
X-Tg ензимен реагент.	1x13ml
Микроплака натоварена със стрептавидин	96 Wells
Концентрат на миеш разтвор	1x 20ml
Серумен дилуент	1x20ml
субстрат А	1x7ml
субстрат В	1x7ml
Стопиращ разтвор.	1x8ml
инструкция	1

Заб. 1: Не използвайте компоненти с изтекъл срок

Заб. 2: Отворените флакони са стабилни до 60 дни ако се съхраняват на 2-8°C.

Заб. 3: Горните реагенти са за една 96-ямкова микроплака.

Заб. 4: Калибраторите са на база човешки серум по стандарт А65/93 за анти-тироглобулинова активност.

Материали, които не са включено:

1. Пипета за обем 10 & 50µl с точност над 1.5%.
2. Диспенсери за пипетиране от 0.100ml и 0.300ml с точност над 1.5%.
3. миялна или гутатор (по избор).
4. Четен на микроплаки с дължина на върната 450nm и 620nm.
5. Асорбираща хартия за попиване на кладенчетата.
6. при инкубацията.
7. Вакуумен аспиратор – по желание – за измиванията.
8. Епруветки за разреждането на пробата.
9. Хронометър.
10. Контролни материали.

ПРЕПАЗНИ МЕРКИ

Само за Vitro диагностика

Да не се прилага нито вътрешно нито външно на хора и животни

Всички компоненти съдържат човешки серум но са измивани и не съдържат повърхностен ентиген на хепатити В, HIV 1&2 и HCV
Антителата са от реагенти, лицензирани от FDA.

ВЗЕМАНЕ НА ПРОБАТА И ПОДГОТОВКА

Използвайте кръвна проба и прилагатите правилата за работа с венозна кръв, за предпочитане пробата да бъде взета сутрин, в епруветка без добавки и антикоагуланти, с червена капачка. Оставете кръвната проба да коагулира.

Центрофугируйте спесимена да отделите серума. Пробите могат да се съхраняват в хладилник при 2-8°C максимум до 5 дни. Ако не може да направите анализа през това време можете да замразите пробите -20°C до 30 дни. Избягвайте замразява и размразявате. Ако правите анализ на две проби ви е необходим спесимен for 0.050ml.

ПОДГОТОВКА:

1. Дилуент

Разтворете серумния дилуент с 200ml в подходяща епруветка с дестилирана или де-йонизирана вода. Съхранявайте на 2-8°C.

2. Миеш буфер

Разтворете съдържанието на миешия концентрат до 1000ml с дестилирана или дейонизирана вода в подходящ за съхранение съд. Съхранявайте на стайна температура 20-27°C до 60 дни.

3. Работен разтвор

Налейте съдържанието на флакона „А“ във флакона с етикет разтвор „В“ Поставете жълтата капачка на празния флакон за лесно идентифициране. Смесете и сложете етикет, съхранение съответно на 2-8°C до 60 дни.

Забележка: Не използвайте работния субстрат ако има синкав цвят.

4. Разреждане на пациентската проба (1/100)

Накапете по 0.010ml (10µl) от всяка проба в 1ml серумен разтвор. Покрийте и разметесете добре чрез инверсия. Съхранявайте на 2-8°C до 48 часа.

ПРОЦЕДУРА

Преди за направите анализа оставете на стайна температура (20 - 27° C) всички компоненти и контроли.

1. Отделете кладенчетата за всеки серум, контрола и пациентски спесимен така, че да направите дублиращ анализ. **Неизползваните стрипове поставете отново в алуминиевото плоче и съхранявайте на 2-8°C.**

2. Пипетирайте 0.050 ml (50µl) от съответния серумен референт, контролата или спесимена в определеното кладенче.

3. Прибавете 0.100 ml (100µl) от Tg Biotin reagenta във всяко кладенче.

4. Разклатете микроплаката леко за 20-30 сек за да размесите и покрийте.

5. Инкубирайте 60 мин на стайна температура.

6. Излейте съдържанието на микроплаката или аспирирайте. Можете да използвате попивателна ако само изливате плаката.

7. Прибавете 300µl миеш буфер (виж раздела Подготовка на реагентите), излейте и попиете или аспирирайте. Повторете от 2. за да направите общо 3 измивания.

Може да използвате автоматична или мануална миялна като следвате съответните инструкции. Ако използвате гутатор избягвайте образуването на мехурчета при изпразването на миешия разтвор. Излейте миешия разтвор и направете това още 2 пъти.

8. Прибавете 0.100ml (100µl) от Tg ензимния реагент във всички кладенчета. Винаги работете в една и съща последователност за да намалите разликите във времето на реакция в различните кладенчета.

НЕ РАЗКЛАЩАЙТЕ ПЛАКАТА СЛЕД ДОБАВЯНЕТО НА ЕНЗИМА.

9. Икубирайте 30 мин на стайна температура.
10. Повторете стъпки 6 & 7 както по-горе.
11. Прибавете 0.100µl от работния субстрат към всички кладенчета (раздел Подготовка на реагентите). Винаги прибавяйте реагентите в същата последователност за минимални разлики в ъв времето на реакция между кладенчетата.

НЕ РАЗКЛАЩАЙТЕ ПЛАКАТА СЛЕД ДОБАВЯНЕТО НА ЕНЗИМА.

12. Инкубирайте на стайна температура 15 мин.
13. Прибавете 0.050 ml (50µl) от стопирация разтвор към всяко кладенче и леко разклатете за 15-20 сек. Винаги прибавяйте реагентите в същата последователност за минимални разлики в ъв времето на реакция между кладенчетата.
14. Отчетете абсорбцията във всяко кладенче на 450nm (използвайте референтна дължина 620-630nm за неутрализирате разликите между кладенчетата) в четец на микроплаки.

Резултатът трябва да бъде отчетен в рамките на 30 мин след прибавянето на стопирация разтвор.

Забележка: при повторното анализиране на спесимени с концентрация над 2000IU/mg разрежете пробата допълнително 1:5 на 1:10 като използвате първоначално разределения материал. Умножете по фактора на разреждането за да получите концентрацията на спесимена.

КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

Всяка лаборатория трябва да анализира контроли в нормалната, граничната и високата област за мониториране на провеждания анализ. Стойностите на тези контроли трябва да бъдат третираны като неизвестни и стойностите да бъдат определяни при всяка провеждана процедура. Картите на качествения контрол трябва се пазят за да следите работата на реагентите. Използвайте статистически методи за проследяване. Всяка лаборатория трябва да има своите приемливи граници на резултатите. Освен това максималната абсорбция трябва да съответства на вече добития опит. Значителното отклонение от установените нива може да е показателно за незабелязани отклонения от установените практики или влошаване на качеството на реагентите. Използвайте пресни реактиви за да установите причината за разликите.

РЕЗУЛТАТИ

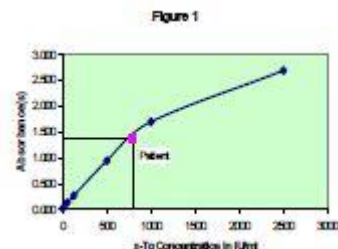
Кривата доза-отговор се използва за потвърждаване на концентрацията на анти-Tg в неизследван спесимен.

1. Запишете стойностите на абсорбцията, получени на принтера на микрочетца, пример 1.
2. Начертайте кривата като използвате средната абсорбция на всеки двойно-анализиран серум спрямо съответния анти-Tg в IU/ml на милиметрова хартия.
3. Начертайте кривата по отбелязаните точки (виж фиг.1)

4.3а да определите нивото на анти-Tg активността на неизследван спесимен нанесете средната абсорбция на двата анализа за всеки неизвестен на вертикалната ос на графиката, намерете пресечната точка на кривата и отчетете концентрацията (в IU/ml) на хоризонтала. При следния пример средната абсорбция (1.387) съответства на кривата на 970 IU/ml анти-Tg концентрация (фиг.1).

ИД на пробата	№ на кладенчето	Abs (A)	Средна абс (A)	Обем IU/ml
CAL A	A1	0.022	0.025	0
	B1	0.028		
CAL B	C1	0.135	0.133	50
	D1	0.131		
CAL C	E1	0.28	0.27	125
	F1	0.261		
CAL D	G1	0.962	0.949	500
	H1	0.936		
CAL E	A2	1.709	1.703	1000
	B2	1.698		
CAL F	C2	2.73	2.698	2000
	D2	2.667		
Patient	E2	1.39	1.387	970
	F2	1.383		

Данните за пример 1 и фиг. 1. не трябва да се приемат за действителни за стандартна крива за извършен анализ.



Параметри на камествения контрол – за да са валидни резултатите трябва да са изпълнение следните критерии:

1. Абсорбцията на калибратора (ОД) 'F' трябва да бъде ≥ 1.3 .
2. Четири от общо 6 качествени контрола трябва да бъдат в рамките на установения обхват.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. За възпроизводимостта е важно времето на реакцията във всяко кладенче да е еднакво. Пипетирането на пробите да не е над 10 мин за да не се удължи анализ. Ако анализирате повече от 1 плака по-добре да начертаете нова крива. С прибавянето на субстрата се стартира кинетична реакция, която се прекратява с прибавянето на стопирация разтвор. Затова добавянето на субстрата и стопирация разтвор трябва да бъде в същата последователност за да се избегне разликата във времето на реакцията.

3. Апаратите измерват вертикално, не докосвайте дъното на кладенчето.

4. Ако не излеете добре съдържанието чрез наклоняване или аспириране при отделните измивания може да не получите верни резултати или разминаване при двойните анализи.

5. Много високата концентрация на анти-TPO в спесимена може да замърси пробите, направени непосредствено след това и могат да са показателни за кръстосано замърсяване. Повтаряйте всяка проба, направена след спесимен показал абсорбция над 3.0 единици.

6. Пробите, които са с микробиологично замърсяване не трябва да се анализират.

Интерпретиране

1. Ако използвате компютърно редуциране на резултатите задължително е предполагаемите стойности на калибрацията да бъдат в рамките на 10% от получените концентрации.

2. Наличието на автоантитела на Tg е сигурно когато нивото на серума е над 125 IU/ml. Клиничното значение на резултатите заедно с активността на анти-тиропероксидазата трябва да се използва за оценка на тироидното състояние. Въпреки това клиничното заключение не трябва да се основава само на този резултат а да е свързан с другите показания на пациента и другите анализи.

3. Ползата от анализа е най-голяма ако резултатите от анализа на анти-тироглобулиновите нива са в съответствие с TPO. Широко разпространената практика на едновременно провеждане на двата теста обаче се оспорва.

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

Направени са изследвания за определяне на очакваните стойности на анти-Tg с тази методика. Броят (n), средното (x) и стандартното отклонение са дадени в табл. 1. Стойностите надвишаващи 125 IU/ml се приемат за положителни за наличието на анти-Tg антитела.

Таблица 1
Очаквани нива на анти- Tg Elisa

(IU/ml)	
брой	100
средно	74.3
Стандартно откл.	25.2
Над 95% (2 SD) ниво	124.7

Важно е да се има предвид, че има определен обхват, който може да бъде установен с даден метод за даден брой пациенти, считани за здрави: спецификата на метода, изследваните пациенти и точността на метода зависят от специалистта, провеждащ изследването. По тази причина всяка лаборатория трябва да има предвид очакваните стойности, определени от производителя само до установяването на свои стойности за даден метод и населението на района в който се работи.

ХАРАКТЕРИСТИКИ

А. Презициост

Три различни нива контролни серуми бяха използвани за определяне точността на анализа.

Таблица 2
Точност при анализ (IU/ml)

проба	брой	средно	SD	CV
Pool 1	20	65.5	3.3	5.0%
Pool 2	20	385.5	15.5	4.0%
Pool 3	20	1554.4	55.4	3.6%

Таблица 3
Точност между анализи (IU/ml)

проба	брой	средно	SD	CV
Pool 1	10	66.8	3.6	5.3%
Pool 2	10	374.2	18.5	4.9%
Pool 3	10	1625.5	65.2	4.0%

В. Точност

Тест-системата анти-Tg ELISA беше сравнена спрямо anti-Tg Elisa Microplate. Биологични спесимени от здрави и болни пациенти бяха сравнявани. Статусът на болните включваше Хашимото тироидити, болестта на Грейвс, тироидни отоци и тироиден карцином. Общият брой на спесимените – 181. Най-малкото квадратно регресивно уравнение и корелационния коефициент бяха сравнени за анти-TPO и Elisa метод спрямо референтен метод. Резултатите са в табл.4

Biological specimens from normal and disease states populations were used. The disease states included Hashimotos Thyroiditis, Graves Disease, Thyroid nodules as well as thyroid carcinoma. The total number of such specimens were 181. The least square regression equation and the correlation coefficient were computed for the anti-TPO Elisa method in comparison with the reference method. The data obtained is displayed in Table 4.

Таблица 4
Най-малък квадратен регресивен анализ

метод	средно	анализ	Корел.коэф
Fortress method	415.6	$Y=9.7+0.969(x)$	0.995
Reference	419.2		

Малък брой отклонение между анти- Tg Fortress Elisa метода и референтния метод показват близостта на средните стойности. Квадратното уравнение и коефициентът на корелация показват отлично съответствие на метода.

С. Чувствителност

Чувствителността на anti-Tg Fortres Elisa е 5IU/ml.

РЕФЕРЕНЦИИ

1. Degroot LJ, ' Heterogeneity of human antibodies to TPO Thyroperoxidase'. Thyroid Autoimmunity, 207, 177-182 (1990)
2. Ekholm R, ' Biosynthesis of thyroid hormones '. Int Rev Cytol, 120, 243-288 (1990)