

Anti-TG ELISA (EIA-3708)

Иммуноферментный анализ для количественного определения антител к тиреоглобулину в сыворотке или плазме

Версия 3.0

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все реагенты данного набора предназначены только для диагностики *in vitro*.

Необходимо четко придерживаться порядка пипетирования, указанного в данной инструкции. Рекомендуется проводить контроль качества.

Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в оригинальных флаконах.

Не смешивайте компоненты наборов с разными номерами лотов. Не использовать набор после истечения срока годности, указанного на упаковке.

Перед использованием необходимо довести реагенты до комнатной температуры и аккуратно перемешать.

Необходимо следовать следующим правилам безопасности при использовании потенциально инфицированных материалов:

- Запрещается есть, пить и курить в местах хранения реагентов и проведения анализов.

- Не пипетировать реагенты ртом.

- При проведении анализа использовать одноразовые перчатки и тщательно мыть руки после проведения анализа.

Набор содержит компоненты человеческого происхождения. Тестирование подтвердило отсутствие в них поверхностного антигена гепатита В и антител к ВИЧ. Тем не менее, ни один из существующих методов не может гарантировать, что продукты человеческой крови не инфицированы и необходимо рассматривать их как таковые.

Избегать контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметил-бензидин). При контакте ТМБ с участком кожи необходимо тщательно промыть его водой с мылом.

Стоп-раствор содержит соляную кислоту. При контакте с кожей, необходимо тщательно промыть водой пораженный участок и обратиться к врачу.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Кол-во лунок

96

Микротитровальная панель из 12 стрипов по 8 лунок каждый,	1
покрыты антителами к ТГ (hTG)	
АНТИ-ТГ Калибраторы	6 флаконов по 1.5 мл
Концентрации:	
0; 100; 300; 1000; 3000 и 9000 МЕ/мл	
Анти-ТГ Контроли	2 флакона по 1.5 мл
(положительный и отрицательный)	
Буфер для образцов, желтый, концентрат	1 флакон, 20 мл
Раствор ферментного конъюгата (красный)	1 флакон, 15 мл
Субстратный раствор ТМБ	1 флакон, 15 мл
Стоп-раствор (1 М соляная кислота)	1 флакон, 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат	1 флакон, 20 мл

КОНТРОЛИ

Набор из двух контролей, входящий в состав набора.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Образцы:	сыворотка или плазма
Количество образца:	10 мкл образца для разведения с буфером 1:100 100 разведенного образца для одного определения
Общее время инкубации:	60 минут при комнатной температуре (20 - 28 °С)
Диапазон калибровки:	100 - 9000 МЕ/мл
Чувствительность:	10 МЕ/мл
Хранение:	в холодильнике при 2 - 8 °С
Срок годности:	12 месяцев с даты изготовления или до даты срока годности, указанной на упаковке
Количество лунок:	96

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный набор представляет собой иммуносорбентный анализ с ферментной меткой (ELISA). Он разработан для количественного определения IgG аутоантител к Тиреоглобулину (ТГ).

Анализ основан на микротитровальной панели, покрытой антигенами высокой степени очистки. Она состоит из 12 стрипов по 8 лунок каждый.

Связывание анализата, формирование комплексов «сандвич» и ферментная цветовая реакция имеют место на трех этапах анализа:

Этап 1:
Иммунная реакция начинается с пипетирования калибраторов, контролей и разведенных образцов пациента в лунки на микротитровальной панели. Антитела связываются с внутренней поверхностью лунки. После 30-ти минутной инкубации панель промывается промывочным раствором для удаления не реагирующих компонентов сыворотки.

Этап 2:
В лунки пипетируется раствор конъюгата, распознающий аутоантитела, связанные с иммобилизованными антигенами. После 15 минут инкубации излишки конъюгата вымываются.

Anti-TG ELISA (EIA-3708)

Этап 3:
Хромогенный субстрат, содержащий ТМВ (3,3',5,5'-тетраметил-бензидин) раскапывается в лунки. Во время 15 минут инкубации цвет раствора меняется на голубой. Развитие цвета останавливается 1 М соляной кислоты в качестве останавливающего раствора. Цвет раствора меняется на желтый.
Интенсивность цвета прямо пропорциональна концентрации IgG в образце. Оптическая плотность для каждого калибратора графически изображается против концентрации IgG и неизвестные экстраполируются по полученной стандартной кривой.
Для считывания оптической плотности используется спектрофотометр с фильтром 450 нм. Рекомендуется бихроматическое измерение при 600 - 650 нм для сравнения.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Диапазоны для данного набора:

	Анти-ТГ (МЕ/мл)
норма:	< 100
пограничный:	100 – 150
завышенный:	> 150

Положительный результат необходимо проверить с учетом общей клинической картины состояния пациента. Решение о применении терапии принимается индивидуально. Каждой лаборатории рекомендуется установить свои диапазоны значений. Значения, приведенные выше, можно рассматривать как руководство.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Ридер для измерений при 450 нм
- Миксер
- Пипетки 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл

Подготовка реагентов

- дистиллированная вода
- Градуированная емкость на 100 и 1000 мл
- пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

Необязательно:

- Мультиканальный диспенсер
- компьютерная программа для обработки данных

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Все образцы должны быть разведены буфером для образцов 1 : 100. Таким образом 10 мкл образцов разводятся 1000 мкл буфера. Не обязательно забирать кровь натощак. Не требуется какая-либо специальная подготовка. После свертывания отделите сыворотку или плазму центрифугированием.
Образцы хранить при 2 - 8 °С по крайней мере 5 дней. До шести месяцев образцы могут храниться замороженными при -20 °С. После разморозки не замораживать повторно.
Ни билирубин, ни гемолиз не имеют значения при проведении анализа.

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Все компоненты данного набора предоставляются в жидком виде и готовы к использованию, кроме буфера для образцов и промывочного буфера. При хранении при 2 - 8 °С компоненты стабильны до 30 после вскрытия или до даты срока годности, указанной на упаковке. Неиспользованные стрипы необходимо хранить при 2 - 8 °С с влагопоглотителями в плотно закрытой упаковке.

Подготовка буфера для образцов

Развести содержимое каждого флакона концентрата буфера для образцов (5х) дистиллированной водой до общего объема 100 мл перед использованием. Хранить в холодильнике: стабильны при 2 - 8 °С по крайней мере 30 дней или до даты срока годности, указанного на упаковке.

Подготовка промывочного раствора

Развести содержимое каждого флакона концентрата промывочного раствора (50х) дистиллированной водой до объема 1000 мл перед использованием. Хранить в холодильнике: стабильны при 2 - 8 °С по крайней мере 30 дней или до даты срока годности, указанного на упаковке.

ПРИМЕЧАНИЯ

Рекомендуется регулярно проводить исследования на контрольных сыворотках для проверки набора Концентрации контролей приводятся на ярлыке флакона.

Пипетирование

Использовать микропипетки с одноразовыми наконечниками для пипетирования образцов сыворотки и плазмы. Пипетировать на дно лунки новыми наконечниками для каждого образца. Образцы пациента с ожидаемыми высокими концентрациями необходимо дополнительно развести буфером для образцов. Дополнительное разведение необходимо учитывать во время подсчета результатов.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Чувствительность

Минимальный определяемый уровень для данного анализа составляет 10 МЕ/мл.

Параллелизм

Разведенные буфером сыворотки с высокими концентрациями антител тестировались на данном наборе и показали линейность на всем диапазоне измерений.

Точность

Внешний тест		
№ образца	Среднее значение [МЕ/мл]	Коеф. вариации [%]
1	746	2.6
2	1398	2.4
3	4674	5.0

Внутренний тест		
№ образца	Среднее значение [МЕ/мл]	Коеф. вариации [%]
1	765	5.7
2	1500	2.3
3	5565	4.0

Anti-TG ELISA (EIA-3708)

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Довести все компоненты до комнатной температуры перед проведением анализа.

Развести все образцы буфером 1:100 перед проведением анализа. Например: 10 мкл образца + 1000 мкл буфера. Хорошо перемешать. Калибраторы и контроли готовы к использованию и не требуют разведения.

1. Подготовить необходимое количество стрипов для калибраторов, контролей и разведенных образцов пациентов.

	1	2	3	4	5	6
A	SA	SE	P1	P5		
B	SA	SE	P1	P5		
C	SB	SF	P2	P..		
D	SB	SF	P2	P..		
E	SC	C1	P3			
F	SC	C1	P3			
G	SD	C2	P4			
H	SD	C2	P4			

SA - SF: стандарты A - F
 P1, P2... образцы 1, 2 ...
 C1: положительный контроль
 C2: отрицательный контроль

2. Раскапать **100 мкл калибраторов, контролей and разведенных образцов** в соответствующие лунки..
3. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (20 - 28 °C).
4. Удалить содержимое лунок и промыть **3 раза 300 мкл промывочного раствора**.
5. Раскапать **100 мкл раствора ферментного конъюгата** в каждую лунку.
6. Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
7. Удалить содержимое лунок и промыть **3 раза 300 мкл промывочного раствора**.
8. Раскапать **100 мкл раствора ТМБ** в каждую лунку.
9. Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
10. Добавить **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку и оставить на 5 минут.
11. Читать оптическую плотность при **450 нм** и подсчитать результаты. Рекомендуется бихроматическое измерение при 600-650 нм.

**Цвет реакции стабилен 30 минут.
 Оптическую плотность необходимо считать за этот период времени.**

ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для данного анализа рекомендуется использовать 4-параметровую функцию с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации.

Подсчитайте значения оптической плотности для каждой калибровочной лунки. На линейно-логарифмической бумаге отметьте усредненные значения оптической плотности каждого калибратора против его концентрации. Постройте стандартную кривую. Концентрации образцов можно высчитать путем интерполяции по стандартной кривой.

ПРИМЕР РАСЧЕТОВ

Данные, приведенные ниже могут использоваться только в качестве иллюстрации.

№	Положение	ОП 1	ОП 2	Среднее	Конц. 1	Конц. 2	Среднее	задан. конц.	КВ %
ST1	A 1/A 2	0.028	0.029	0.028	1.7	1.7	1.7	0.0	0
ST2	B 1/B 2	0.184	0.176	0.180	99	93	96	100	4
ST3	C 1/C 2	0.452	0.433	0.443	318	300	309	300	4
ST4	D 1/D 2	0.970	1.937	0.954	1016	955	986	1000	3
ST5	E 1/E 2	1.571	1.555	1.563	3075	2979	3027	3000	1
ST6	F 1/F 2	2.011	1.986	1.998	9370	8603	8986	9000	1

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).