



## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

Кат. №: EIA-3708  
Производитель: DRG Instruments GmbH, (Германия)

Методика от 06-2011  
Версия 3.0

### НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный тест предназначен для количественного определения антител класса IgG к тиреоглобулину в сыворотке или плазме человека методом твердофазного иммуноанализа. Только для использования в in-Vitro диагностике.

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

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

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

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. В лунки пипетируется раствор конъюгата, распознающий аутоантитела, связанные с иммобилизованными антигенами. После 15 минут инкубации излишки конъюгата вымываются. Хромогенный субстрат, содержащий ТМБ (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.

### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Все реагенты данного набора предназначены только для диагностики in vitro.
2. Необходимо четко придерживаться порядка пипетирования, указанного в данной инструкции. Рекомендуется проводить контроль качества.
3. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в оригинальных флаконах.
4. Не смешивайте компоненты наборов с разными номерами лотов. Не использовать набор после истечения срока годности, указанного на упаковке.
5. Перед использованием необходимо довести реагенты до комнатной температуры и аккуратно перемешать.
6. Запрещается есть, пить и курить в местах хранения реагентов и проведения анализов.
7. Не пипетировать реагенты ртом.
8. При проведении анализа использовать одноразовые перчатки и тщательно мыть руки после проведения анализа.
9. 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.
10. Избегать контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметил-бензидин). При контакте ТМБ с участком кожи необходимо тщательно промыть его водой с мылом.
11. 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, покрыты антителами к ТГ (hTG)	1
АНТИ-ТГ Калибраторы	6 флаконов по 1.5 мл
Концентрации: 100; 300; 1000; 3000 и 9000 МЕ/мл	
Анти-ТГ Контроли (положительный и отрицательный)	2 флакона по 1.5 мл
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

### НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

#### Оборудование

- Ридер для измерений при 450 нм
- Мультиканальный диспенсер или пипетка на 100 мкл
- Миксер
- Пипетки 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл
- Таймер
- Компьютерная программа для обработки данных

#### Подготовка реагентов

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Градуированная емкость на 100 и 1000 мл
- Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

**ЗАБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ**

1. Забрать образцы цельной крови, избегая гемолиза.
2. Дать крови свернуться и отделить сыворотку центрифугированием.
3. Тестируемая сыворотка должна быть прозрачной и негемолизированной. Избегать гемолиза или липемии; хотя это не влияет на проведение анализа.
4. Образцы хранить при 2 - 8 °С по крайней мере 5 дней. До шести месяцев образцы могут храниться замороженными при -20 °С.
5. Избегать повторного замораживания-оттаивания образцов сыворотки.
6. Не рекомендуется тестирование образцов, деактивированных теплом.

**ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ**

1. Не использовать компоненты набора после окончания срока годности.
2. Не смешивайте компоненты наборов с разными номерами лотов.
3. Перед использованием необходимо довести реагенты до комнатной температуры.
4. Подготовить все образцы и реагенты до начала анализа. После начала анализа, проводить его непрерывно для получения надежных результатов.
5. Соблюдать порядок проведения теста.
6. Использовать только свежее разведенные образцы.
7. Пипетировать все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Во избежание загрязнения, менять наконечники для образцов и контролей.
9. Тщательно мыть микролунок и просушивать их.
10. Проводить все шаги инкубации с одинаковым промежутком времени.
11. Тестировать контрольные сыворотки или пулы для проверки работы реагентов и теста.
12. Не использовать лунки повторно.

Для всех контролей соответствующие концентрации указаны на этикетках. При использовании этих данных может быть построена калибровочная кривая для полуколичественного определения результатов.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ****Подготовка буфера для образцов**

Развести содержимое каждого флакона концентрата буфера для образцов (5x) дистиллированной водой до общего объема 100 мл перед использованием. Хранить в холодильнике: стабилен 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 (50x) 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.

**Подготовка образца**

Развести все образцы пациентов **1:100** с разбавителем для образцов. Для этого соединить 10 мкл образца и 990 мкл буфера для образцов в пробирке и тщательно перемешать.

Контроли готовы к использованию. Не разбавлять.

**ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Подготовить необходимое количество стрипов для калибраторов, контролей и разведенных образцов пациентов.
2. Пипетировать **100 мкл** калибраторов, контролей и разведенных образцов в дублях в соответствующие лунки.
3. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (20 - 28 °С).
4. Удалить содержимое лунок и промыть **3 раза 300 мкл** промывочного раствора.
5. Пипетировать **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. Пипетировать **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.

**Автоматизация**

Процедура теста, описанная выше, подходит для использования с или без автоматизации.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ****Контроль качества**

Тест считается действительным только, если оптическая плотность при 450 нм для Положительного Контроля (1) и Отрицательного Контроля (2), а также для Калибраторов А и F совпадают с указанными диапазонами.

**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	зadan. 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

**Интерпретация результатов**

В анализе было использовано 250 образцов, были получены следующие значения:

**Анти-TG (Ед/мл)**  
 Нормальные: < 100  
 Граничные: 100 – 150  
 Повышенные: > 150

**ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА****Параллелизм**

Разведенные буфером сыворотки с высокими концентрациями антител тестировались на данном наборе и показали линейность на всем диапазоне измерений. См. таблицу в оригинале инструкции.

**Точность**

Внешний тест			Внутренний тест		
№ образца	Среднее значение [МЕ/мл]	Коеф. вариации [%]	№ образца	Среднее значение [МЕ/мл]	Коеф. вариации [%]
1	746	2.6	1	765	5.7
2	1398	2.4	2	1500	2.3
3	4674	5.0	3	5565	4.0

**Чувствительность**

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

**Специфичность**

Данный тест определяет специфичные антитела класса IgG к человеческому тиреоглобулину.

**Калибровка**

Данная система калибрована против WHO контрольной подготовки 65/93 для анти-тиреоглобулина. WHO измеряется как 1000 Ед/мл анти-TG.

**ОГРАНИЧЕНИЯ**

Бактериальное загрязнение или повторные циклы замораживания-оттаивания образцов могут повлиять на результаты. У пациентов с ослабленным иммунитетом и новорожденных серологические данные имеют ограниченные значения.

**ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ СУБСТАНЦИИ**

Интерференция не наблюдалась при реакции с гемолитическими (до 1000 мг/дл), липемическими (до 3г/дл триглицеридов) или билирубином (до 40 мг/дл) образцами. Антикоагулянты также не влияют на результаты.

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

ООО «**ДИАМЕБ**»  
 ООО «**БиоТехЛаб-С**»  
 ул. Чорновола, 97  
 г. Ивано-Франковск, 76005  
 тел.: +38 (0342) 775 122  
 факс: +38 (0342) 775 612  
 e-mail: [www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)  
[www.biotechlab.com.ua](http://www.biotechlab.com.ua)