



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЕ В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

Кат. №: EIA-3561
 Производитель: DRG Instruments GmbH, (Германия)

Методика от 06-2011
 Версия 5.0

НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный тест предназначен для количественного определения антител класса IgG к тиреопероксидазе 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).

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

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 между буферным раствором и легко окисляющимися материалами. При контакте ТМВ с участком кожи необходимо тщательно промыть его водой с мылом.
11. При уничтожении отходов придерживаться установленных норм.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Кол-во лунок	96
Микротитровальная панель из 12 стрипов по 8 лунок каждый, покрыты высоко очищенной человеческой тиреопероксидазой (ТРО). Готовы к использованию	1
АНТИ-ТРО Калибраторы	6 флаконов по 1.5 мл
Концентрации: 0; 33;100; 330; 1000; 3000 МЕ/мл. Готовы к использованию	
Анти-ТРО Контроли	2 флакона по 1.5 мл
(положительный и отрицательный). Готовы к использованию	
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

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Набор хранить при 2-8 °С.
2. Лунки хранить запечатанными в сухой упаковке с влагопоглотителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока годности.
4. Не подвергать влиянию прямых солнечных лучей и тепла.
5. Разбавленные буфер для образцов и промывочный буфер стабильны до 30 дней при хранении при 2-8 °С.

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 свежесозданные образцы.
7. Пипетировать все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Во избежание загрязнения, менять наконечники для образцов и контролей.
9. Тщательно мыть микролунки 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 (5х) 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 (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.

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	задан. конц.	КВ %
ST1	A 1/A 2	0.053	0.054	0.054	0.001	0.001	0.001	0.0	1
ST2	B 1/B 2	0.220	0.232	0.226	25.9	28.3	27.1	33	4
ST3	C 1/C 2	0.487	0.475	0.461	95.2	91.5	93.4	100	2
ST4	D 1/D 2	0.922	1.045	0.984	283.4	360.0	321.7	330	8
ST5	E 1/E 2	1.686	1.693	1.689	1103	1117	1110	1000	0
ST6	F 1/F 2	2.188	2.153	2.171	2905	2686	2797	3000	1

Интерпретация результатов

В изучении в нормальных диапазонах были получены следующие значения:

Анти-ТРО (Ед/мл)

Нормальные: < 50

Граничные: 50 – 75

Повышенные: > 75

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		
№ образца	Среднее значение [МЕ/мл]	Коеф. вариации [%]
1	377	3.1
2	835	3.5
3	2287	9.7

Внутренний тест		
№ образца	Среднее значение [МЕ/мл]	Коеф. вариации [%]
1	324	1.6
2	761	2.9
3	2173	1.5

Чувствительность

Минимальный определяемый уровень для данного анализа составляет 5 МЕ/мл.

Специфичность

Данный тест определяет специфичные антитела класса IgG к человеческой тиреопероксидазе.

Калибровка

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

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

www.biotechlab.com.ua