



## Набор ИФА для определения ТИРЕОГЛОБУЛИНА (hTg)

Кат. № : KT20IW  
Количество : 96  
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 09-2003

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

### 1. НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ является иммуноферментометрическим анализом для количественного определения тиреоглобулина в человеческой сыворотке.

**ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO**

### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Это набор основан на методе иммуноферментометрического анализа (ИФМА). Используются четверо различных моноклональных антител анти-hTg, три нанесенные на лунки и четвертое конъюгированное с биотином. В течение инкубации hTg, присутствующий в калибраторах и образцах, связывается с антителами и биотинилатом, формируя многослойный материал типа «сэндвич». В конце инкубации, свободный материал удаляется циклом аспирации/промыывания. Затем во все лунки добавляется раствор стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (HRPO). Это приведет к взаимодействию биотинилированными антителами, которые являются связанными с лункой. После дальнейшего цикла аспирации/промыывки, остаточная ферментная активность, обнаруживаемая в лунках, будет таким образом прямо пропорциональной концентрации hTg в калибраторах и образцах и будет наблюдаться при добавлении в лунки раствора хромогена (ТМВ) в буфере субстрата. Колориметрическое считывание будет проводиться с использованием спектрофотометра при длине волны 450 нм и 405 нм.

### 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 2 месяцев.

#### 3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

- **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок, покрытых моноклональным антителом (мишиным) анти-hTg. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой пакет тщательно закрытыми.
- **Калибраторы:** 1 флакон (2 мл) нулевого калибратора и 6 флаконов (1 мл) hTg в протеиновой основе следующих концентраций: 1, 3, 10, 30, 100 и 300 нг/мл. Консервант: NaN3 (<0.1%). Готовы к использованию.  
**Примечание:** точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- **Раствор для восстановления:** 1 флакон (3 мл) hTg в протеиновой основе в концентрации 50 нг/мл. Консервант: NaN3 (<0.1%). Готовый к использованию.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (15 мл) стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRPO), в Tris буфере, содержащим BSA и стабилизаторы. Консервант: неомицин. Готов к использованию.
- **Анти-hTg-биотин:** 1 флакон (13 мл) анти-hTg моноклонального IgG, конъюгированного биотином, в PBS и BSA. Консервант: NaN3 (<0.1%). Готовый к использованию.
- **Контрольная сыворотка:** 2 флакона hTg в протеиновой основе трех разных концентраций. Консервант: NaN3 (<0.1%). Готова к использованию.  
**Примечание:** точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.

#### 3.2 ОБЩИЕ РЕАГЕНТЫ для всех наборов гормонов Radim

- **Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween. Консервант: тимеросал (<0.05%). Разбавить содержимое флакона дистиллированной водой до 500 мл. В случае нерастворимых кристаллов перерастворите раствор, поместив флакон на несколько минут в теплоту 37°C. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 30 дней при 2-8°C.
- **Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМВ с цитрат-фосфатным буфером и DMSO. Готовый к использованию.
- **Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H2O2. Готовый к использованию.  
**Примечание:** Чтобы получить раствор субстрата смешайте равные порции хромогена и субстратного буфера, используя чистый, тщательно очищенный флакон. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течении 1 часа после подготовки.
- **Стоп раствор:** 1 флакон (14 мл) 1N H2SO4. Готовый к использованию.
- **Самоклеющаяся пленка.**
- **Полиэтиленовый пакет.**

### 4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

#### 4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Мерные колбы для разбавления реагентов.
- Микропланшетный шейкер, установленный на 1200 об/мин.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с интервалом 0-3,0 А при длине волны 450 и 405 нм.
- Миллиметровая графопостроительная бумага.
- Дистиллированная вода.

#### 4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

### 5. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

**Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:**

- Не смешивайте специфические реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
  - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
  - периодам инкубации и температуре,это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбопытная промывка лунок может привести к неправильным

- классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
  - Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
  - Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
  - Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
  - Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

**Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:**

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержать используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

## 6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Храните образцы при  $2-8^{\circ}\text{C}$  в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы в равных частях до  $-20^{\circ}\text{C}$ . Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Образцы с концентрациями hTg более чем 300 нг/мл необходимо разбавить нулевым калибратором. Рекомендуется проводит разбавление в соотношении 1:5 (100 мкл образца + 400 мкл нулевого калибратора).

## 7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА\*

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
  - переворачивая образец, смешайте его перед использованием.
1. Приготовьте лунки для: бланка, калибраторов, контрольной сыворотки и образцов.
  2. Пипетируйте **50 мкл** каждого калибратора, контрольной сыворотки и образца в соответствующие лунки.
  3. Пипетируйте **100 мкл** анти-hTg-биотина во все лунки, кроме лунки бланка. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой и осторожно перемешайте.
  4. Инкубируйте микропланшеты в течении **90 +/- 5 мин. при КТ (18-25°C)** на орбитальном шейкере при 1200 об/мин.
  5. Удалите пленку и осторожно аспирируйте инкубационную смесь из всех лунок.
  6. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.

7. Пипетируйте **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку кроме бланка. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой и осторожно перемешайте.
8. Инкубируйте микропланшеты в течении **30 +/- 2 мин. при КТ (18-25°C)** на орбитальном шейкере при 1200 об/мин.
9. Удалите пленку и осторожно аспирируйте инкубационную смесь из всех лунок.
10. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
11. Пипетируйте **200 мкл** раствора хромоген-субстрата во все лунки.
12. Инкубируйте лунки **15 мин. при КТ (18-25°C)**. Избегайте попадания прямого солнечного света.
13. Пипетируйте **100 мкл** стоп раствора во все лунки.
14. Считайте ОП желателно бихроматичным фотометром при 450 нм с контрольной длиной волны 620 нм (обнулив аппарат лункой бланка) в течении **20 минут** после завершения анализа. В случае выхода абсорбции из диапазона считайте ее при 405 нм.

\* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

**8. СХЕМА АНАЛИЗА** (см. стр. 27 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 концентрациями TgAb от 0 до 30 нг/мл считайте при длине волны 450 нм; для образцов с TgAb более чем 30 нг/мл, считывайте при длине волны 405 нм.

Нарисуйте калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибратора (ось x) напротив абсорбции для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации TgAb в мкМЕ/мл получаются путем интерполяции абсорбций каждого образца на калибровочной кривой; в случае разбавленных образцов умножьте на фактор разбавления.

### 9.1 ПРИМЕР ВЫЧИСЛЕНИЯ

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные.

Калибратор/ образец (нг/мл)	Абсорбция при 450 нм	hTg	Абсорбция при 405 нм	hTg
Калибратор 0	0.020		0.007	
Калибратор 1	0.127		0.045	
Калибратор 3	0.287		0.102	
Калибратор 10	0.813		0.290	
Калибратор 30	2.063		0.737	
Калибратор 100	> 3.000		1.503	
Калибратор 300	> 3.000		2.488	
Образец 1	1.150	15.4 нг/мл	0.411	
Образец 2	> 3.000		1.829	166.4 нг/мл

### 9.2 Значения нормы

Указанные ниже значения считаются показательными. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный диапазон нормы. Значения нормы были установлены на 85 здоровых лицах без отклонений щитовидной железы. Уровни тиреоглобулина оказались **ниже 40 нг/мл**.

### 9.3 Критерии оценки

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что значение концентрации контрольной сыворотки указано в значении листа Контроля Качества.

## 10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

### 10.1 Специфичность

Не было обнаружено перекрестной реактивности с MIT, DIT, гТ3, Т3, Т4, TSH, FSH и LH. Этот аналитический метод показал перекрестную реактивность 0,01% с человеческим TgG.

### 10.2 Чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе, значительно отличающейся от нулевого калибратора (средн. значение + 2 СО).

**Эта доза составляет 0,15 нг/мл.**

**10.3 Точность**

Точность внутри и между анализами определена путем измерения повторяемости и воспроизводимости анализа (вариабильность внутри и между анализами) на 3 сыворотках при разных концентрациях hTg.

**Повторяемость (внутри анализа)**

4 сыворотки анализированы в 10 репликациях.

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во репликатов
A	1,69	0,10	5,91	10
B	15,08	0,30	1,99	10
C	152,41	5,71	3,74	10

**Воспроизводимость (между анализами)**

2 репликации каждой сыворотки анализируются в разных отдельных анализах.

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во анализов
A	1,83	0,13	7,10	10
B	15,69	0,85	5,41	10
C	150,39	9,30	6,18	10

**10.4 Тщательность**

Проверена при использовании параллельных анализов.

**Испытание на восстановление**

Известные количества hTg были добавлены к 2 сывороткам в норме и проанализированы.

Добавлено (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)	Восстановление %
S1	---	1.9	---
S1 + 12.5	14.4	14.9	103.5
S1 + 25	26.9	25.2	93.7
S1 + 50	51.9	50.7	97.7
S1 + 100	101.9	93.6	91.8
S1 + 200	201.9	195.00	96.6
S2	---	17.4	---
S2 + 12.5	29.9	27.0	90.3
S2 + 25	42.4	42.0	99.0
S2 + 50	67.4	65.0	96.4
S2 + 100	117.4	116.2	99.0
S2 + 200	217.4	205.1	94.3

**Испытание на параллелизм**

2 сыворотки с высокой концентрацией hTg были проверены нулевым калибратором при разных разбавлениях.

Разбавление	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)
S1 неразбавл.	---	179.50
1:2	89.75	84.75
1:4	44.88	47.57
1:8	22.44	28.46
S2 неразбавл.	---	25.69
1:2	12.85	15.05
1:4	6.42	6.97
1:8	3.21	3.83

**10.5 «Хук-эффект»**

Всякий раз, когда образцы с очень высокими концентрациями антигена анализируются неразбавленными в двухэтапном «сэндвич»-методе, как в этом наборе, "хук-эффект" может дать значения концентраций явно ниже чем фактические значения. Этот набор не дает "хук-эффекта" при концентрации до 100 000 нг/мл.

**11. ВОССТАНОВЛЕНИЕ В ОБРАЗЦЕ СЫВОРОТКИ**

Наличие в образце аутоантител анти-hTg влияет на анализ hTg, и таким образом может причинить неточность результатов. Поэтому, необходимо выполнить испытание клинического восстановления, чтобы подтвердить точность результата. Это испытание не должно считаться методом для обнаружения антител анти-hTg.

**Процедура:**

- Разбавить 1/2 образца сыворотки раствором для восстановления, например, 100 мкл образца + 100 мкл раствора для восстановления. Концентрация hTg в растворе для восстановления составляет 50 нг/мл (SR).

- Проверьте неразбавленный образец (S1) и образец, наполовину разбавленный раствором для восстановления согласно схеме анализа.

- Процент восстановленного hTg для образца рассчитывается следующим образом:

$$\text{Восстановление (\%)} = \frac{\text{нг/мл образца S2}}{(\text{нг/мл образца S1} + 50)/2} \times 100$$

Восстановления менее чем 75% или более чем 120% указывают на влияние аутоантител анти-hTg.

**12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА**

Результаты этого анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками и дильнейшими диагностическими исследованиями.

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
ул. Чорновола, 97,  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: (0342) 77 51 22;  
тел./факс: (0342) 77 56 12  
e-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)