



## Набор ИФА для определения антител к ТИРЕОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЕ

Кат. № : KT21IW  
Количество тестов : 96  
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 09-2007

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

### 1. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ предназначен для количественного определения антител к тиреоидной пероксидазе (ТРОАб) в человеческой сыворотке или плазме. Измерение ТРО помогает при определении диагноза некоторых тиреоидных заболеваний. Среди них заболевания Гашимото и Грейва, нетоксический зоб.

### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Это тест основанный на иммуноферментном методе (IEMA). Твердая фаза (полистироловые ячейки) покрытые человеческим рекомбинантом тиреопероксидазы (>95% очищенность) Во время первой инкубации, аутоантитела, присутствующие в калибраторах и образцах связываются с антигеном привитым к твердой фазе. После шага промывания добавляется конъюгат (анти-hIlgG антитело, конъюгированное пероксидазой хрена), что связывается с антителами, захваченными во время первого шага. После шага второй промывки, добавляется раствор хромогена. Энзимная реакция останавливается добавлением стоп раствора. Вырабатываемый окрас прямо пропорциональный концентрации антител ТРО в калибраторах и образцах и измеряется с помощью фотометра при 450 нм.

### 3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8<sup>0</sup>С
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8<sup>0</sup>С в течение 2 месяцев.

#### 3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

1. **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок с привитым человеческим рекомбинантом тиреопероксидазы. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8<sup>0</sup>С в соответствующей полиэтиленовой сумке, тщательно закрытым.
2. **Калибраторы:** 6 флаконов (2 мл) ТРОАб в предварительно разбавленной человеческой сыворотке в следующих концентрациях: 0, 50, 150, 300, 1000 и 3000 Е/мл. Готовы к использованию. Консервант: NaN<sub>3</sub> (<0.1%).
3. **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (15 мл) анти-человеческого IgG, конъюгированного с HRPO в основе сыворотки со стабилизаторами. Консервант: неомицин. Готов к использованию.
4. **Контрольная сыворотка:** 2 флакона (2 мл) предварительно разбавленной человеческой сыворотки. Готова к использованию.  
1 флакон: отрицательная сыворотка;  
1 флакон: положительная сыворотка
5. **Разбавитель образца ТРОАб/ТgAb (концентрированный):** 1 флакон (15 мл) фосфатного буфера с BSA. Разбавить содержимое флакона до 150 мл дистиллированной воды. Консервант: NaN<sub>3</sub> (<0.1%). Разбавленный разбавитель стабилен в течение 30 дней при 2-8<sup>0</sup>С.

#### 3.2 ОБЩИЕ РЕАГЕНТЫ, используемые в линии гормонов Radim:

1. **Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) фосфатного буфера с детергентом. Консервант: (,0,1%) Разбавить содержимое флакона до 500 мл дистиллированной воды. Если будут нерастворимые кристаллы, растворите их, поместив их при 37С на несколько минут. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 30 дней при 2-8<sup>0</sup>С.

2. **Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМВ с цинрат-фосфатным буфером и DMSO.
3. **Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Примечание:** Чтобы получить раствор субстрата, смешайте одинаковое количество хромогена их субстратным буфером, используя темный и чистый флакон. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течение 1 часа со времени приготовления.

4. **Стоп раствор:** 1 флакон (14 мл) 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Готов к использованию.
5. **Самоклеющиеся крышки для планшета**
6. **Полиэтиленовая сумка с зажимом.**

### 4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

#### Ручная процедура

1. Регулируемые автоматические микропипетки со сменными насадками.
2. Градуированный цилиндр
3. Термостатный микропланшетный шейкер, отрегулирован на 37+/-2<sup>0</sup>С и 1200 об./мин.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Микропланшетный фотометр с фильтром 450, 405 и 620 нм.
6. Миллиметровая графическая бумага
7. Дистиллированная вода.

#### Автоматическая процедура

- Этот тест может использоваться на автоматическом иммуноферментном анализаторе
- Мы гарантируем его применение на RADIM и/или Seac автоматическом анализаторе

### 5. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности
- Не храните наборы и образцы при высокой температуре и в местах возможного загрязнения
- Используйте чистую посуду, не содержащую ионы металла или окисляющие вещества
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, что хранится в чистом контейнере
- Избегайте загрязнения между образцами; для этого используйте сменные наконечники для каждого образца и реагента.
- Строго следуйте инструкции. Изменение объема реагентов, времени и температуры инкубирования может вызвать некорректные результаты.
- При ручной процедуре важно использование калиброванных пипеток и наличие технической инструкции. Наиболее важными являются высокая точность приготовления и внесения реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование работает надлежащим образом и откалибровано. Любое отклонение от правильного использования может влиять на репродуктивность и восстановление результатов.
- Используйте подходящий метод для правильной идентификации пациентов.

#### Для предотвращения загрязнения, необходимо соблюдать следующие предостережения:

- используйте перчатки при работе.
- Не пипетируйте реагенты ртом
- Не ешьте, не пейте и не используйте косметику во время анализа
- Будьте внимательны при работе использовании хромогена и стоп раствора. Избегайте контакта с кожей, глазами, слизистыми. При контакте промойте большим количеством воды.
- Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия в качестве консерванта; для предотвращения формирования

взрывоопасных азидов металлов при их выливании смывайте большим количеством воды.

- Не допускайте выливания и формирования испарений; в случае возникновения промывайте 3% раствором гипохлорида натрия. Такие материалы для очистки должны обрабатываться как потенциально инфицированные и уничтожаться надлежащим образом.

## 6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для анализа может использоваться сыворотка или плазма. Сильно липемические или гемолизированные образцы должны уничтожаться. Храните образцы при 2-8С 1-2 дня; при хранении более длительный период образцы желательно заморозить в аликвотах при -20С. Образцы плазмы могут содержать нити фибриногена, что могут влиять на анализ. Избегайте повторного замораживания/ размораживания.

### Разбавление образца

Перед анализом разбавьте образцы 1:101 следующим образом:  
**10 мкл** образца + **1000 мкл** разбавителя.

**Стандарты и контрольные сыворотки уже разбавлены и готовы к использованию.**

## 7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
- переворачивая образец, смешайте его перед использованием.

1. Приготовьте лунки для бланка, калибраторов, контрольной сыворотки и разбавленного образца.
2. Распределите **100 мкл** каждого из калибраторов, контрольной сыворотки и разбавленного образца в соответствующие лунки. Распределите непосредственно по дне каждой лунки.
3. Встряхивайте в течении **60 минут при 37°С**.
4. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию жидкости из лунок кроме бланка.
5. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую ячейку кроме бланка.
6. Встряхивайте лунки **30 мин.** при температуре 37°С.
7. Промойте лунки как описано в п 4.
8. Внесите **200 мкл** раствора хромоген-субстрата во все лунки.
9. Встряхивайте лунки **10 мин.** при температуре 37°С. Избегайте попадания прямого солнечного света.

Разбавление	Ожидаемое значение (Е/мл)	Полученные данные (Е/мл)	Восстановл. (%)
S1 неразбавл.	-	129,1	-
1/2	64,6	63,7	98,6
1/4	32,3	31,9	98,8
1/8	16,2	16,5	101,9
1/16	8,1	9,7	119,7
S2 неразбавл.	-	671,0	-
1/2	335,5	293,7	87,5
1/4	167,8	132,7	79,1
1/8	83,9	56,2	67,0
1/16	41,9	26,3	62,8

10. Добавьте **100 мкл** стоп раствора во все лунки.
11. Считайте ОП бихроматичным фотометром при 450 нм с контрольной длиной волны 620 нм в течении **20 минут** после завершения анализа.

## 8. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ\*

Для достижения большей чувствительности существующий метод включает спектрофотометрическое считывание при двух длинах волн (450 и 405 нм). Для образцов с ТРОАб от 0 до 300 Е/мл считайте при 450 нм, для образцов с ТРОАб более чем 300 Е/мл, считывайте при 405 нм. Нарисуйте калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибратора (ось х) напротив абсорбции для каждого калибратора (ось у). Соответствующие концентрации ТРОАб в Е/мл получают путем интерполяции абсорбций каждого образца на калибровочной кривой.

\*При использовании Radim и/или Seac автоматических анализаторов, считывание можно проводить при 3 разных длинах волн 450, 405 и 620 нм, что дает широкий диапазон кривой.

### 8.1 Пример вычисления

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные (см. таблицу на стр. 19 в оригинале инструкции).

## 8.2 Приемлемый диапазон

Бланк	< 0.100 ОП
Контрольная сыворотка 1 (отриц.)	< 40 Е/мл
Контрольная сыворотка 2 (полож.)	См. вложенную карточку контроля качества

## 8.3 Интерпретация результатов

Нормальные значения определены на 300 образцах и зависят от разных факторов. Рекомендуется установление нормального диапазона каждой лабораторией отдельно.

Нормальные значения для ТРОАб	< 40 Е/мл
Граничные значения для ТРОАб	40 - 75 Е/мл
Повышенные значения для ТРОАб	> 75 Е/мл

## 9. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА

### 9.1 Специфичность

Не была обнаружена перекрестная реактивность с анти-Тg автоантителами в человеческой сыворотке.

### 9.2 Чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе. Значительно отличающуюся от нулевого калибратора (средн. значение + 2 СО – стандартное отклонение). **Эта доза составляет 4,2 Е/мл**

### 9.3 Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения КВ% (коэффициент вариации) 3 сывороток при разной концентрации ТРОАб.

### Внутри анализа

Сыворотка	Средн. (Е/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
A	60,9	7,3	5,7	24
B	714,9	30,6	4,3	24
C	1866,4	218,3	11,7	24

### Между анализами

4 репликаты каждой сыворотки в 10 отдельных анализах.

Сыворотка	Средн. (Е/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
A	59,7	5,9	9,9	10
B	155,9	8,0	5,1	10
C	716,2	48,8	6,8	10

### 9.4 Тщательность

Проверена при использовании параллельных анализов.

### Параллельный анализ

Нулевым калибратором проанализированы 2 сыворотки с разными концентрациями ТРОАб и при разном разбавлении:

### ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор не является сам по себе диагностическим, но он используется в диагностических целях. Определение клинического диагноза не должно основываться на результатах одного анализа и должно учитывать все данные клинических и лабораторных исследований.

### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»  
 Ул. Чорновола, 97,  
 Ивано-Франковск, 76014 а/я 742  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775 612  
 E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)