

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ТИРЕОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЕ

EIA-4114, Anti-Thyroid Peroxidase (Anti-TPO)

Каталог. № : EIA-4114
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 24-09-2015
Версия 3.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Определение антител к тиреоидной пероксидазе (ТРО) в человеческой сыворотке или плазме методом микропланшетного иммуноферментного анализа.

3 ПРИНЦИП

Последовательный метод ИФА

Необходимые реагенты для этого анализа: иммобилизованный антиген, циркулирующее аутоантитело и ферментосвязанные специфические антитела. В этой процедуре иммобилизация имеет место на протяжении анализа на поверхности микропланшета лунки при взаимодействии стрептавидина на дне лунки и экзогенно добавленного биотинилированного антигена тиреоидной пероксидазы. При смешивании биотинилированного антигена и сыворотки, которая содержит аутоантитело, образуется иммунный комплекс как результат реакции антигена и антитела. Это взаимодействие проиллюстрировано на следующем уравнении: (См. в оригинале инструкции).

4 РЕАГЕНТЫ

А. Калибраторы анти-ТРО – 1,0 мл/фл., А-Ф
Шесть (6) флаконов на уровне анти-ТРО 0 (А), 25 (В), 50 (С), 100 (D), 250 (Е), 500 (F) МЕд/мл. Хранить при 2-8 °С. Добавлен консервант. *Примечание:* Калибраторы на основе человеческой сыворотки были калиброваны с использованием эталонного препарата, проверенного Международным стандартом 66/387 к антитиреоидной микросоме.

В. Реагент биотина ТРО – 13 мл/фл.

Один флакон, содержащий антиген биотинилированной тиреоидной пероксидазы в буферной основе. Хранить при 2-8°С. Добавлен консервант.

С. Реагент фермента-антигена анти-ТРО – 13 мл/фл.

Один флакон, содержащий конъюгат анти-человеческой IgG-пероксидазы хрена в буферной основе. Хранить при 2-8°С. Добавлен консервант.

Д. Микропланшет, покрытый стрептавидином – 96 лунок

Один микропланшет на 96 лунок, покрыт стрептавидином, запечатан в алюминиевый пакет с осушителем. Хранить при 2-8°С.

Е. Разбавитель сыворотки – 20 мл

Один флакон с разбавителем сыворотки, содержащий буферные соли и желтый краситель. Хранить при 2-8°С.

Ф. Концентрат промывочного раствора – 20 мл

Один флакон содержащий поверхностно-активное вещество в буферном солевом растворе. Добавлены консерванты. Хранить при 2-8°С.

Г. Субстрат А – 7.0 мл/фл.

Одна бутылка, содержащая ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°С.

Н. Субстрат В – 7.0 мл/фл.

Одна бутылка, содержащая перекись водорода (H₂O₂) в буфере. Хранить при 2-8°С.

И. Стоп раствор – 8.0 мл/фл. Одна бутылка, содержащая сильную кислоту (1N HCl) в буфере. Хранить при 2-8°С.

Ж. Инструкция

Замечание 1: Не используйте реагенты после окончания срока годности.

Замечание 2: Вскрытые реагенты стабильны 60 дней при 2-8°С.

Замечание 3: Выше перечисленные реагенты предназначены только для одного микропланшета на 96 лунок.

4.1 НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Пипетки для внесения объема 10, 25 и 50 мкл с точностью более чем 1,5%.

2. Диспенсер для повторного внесения объема 0,100 мл и 0,350 мл с точностью более чем 1,5%.
3. Микропланшетный промыватель или сдавливающая бутылка (по возможности).
4. Микропланшетный ридер с длинной волны при 450 нм и 620 нм.
5. Абсорбирующая бумага для вытирания лунок.
6. Пластиковая обертка или микропланшетный накрыватель для шага инкубации.
7. Вакуумный аспиратор (по возможности) для шага промывания.
8. Пробирки для разбавления образцов пациентов.
9. Таймер.
10. Материалы контроля качества.

5 ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для использования in-Vitro.

Не для внутреннего или внешнего применения на людях или животных.

Все продукты, содержащие человеческую сыворотку и проверенные одобренными FDA реагентами, дали отрицательных результат по отношению к поверхностному антигену вируса гепатита В, ВИЧ ½, антителам к ВГС. Поскольку, 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. Описание лабораторных процедур поведения с продуктами крови можно найти в Центре Контроля заболеваний/Национального института здоровья.

6 СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови, сыворотки или плазмы обычной венопункцией при соблюдении необходимых правил безопасности. Для получения точных результатов необходима утренняя сыворотка пациента, который воздерживается от приема пищи. Кровь нужно собрать в обычную пробирку с красной полоской для венопункции, не используя никаких добавок или антикоагулянтов (для сыворотки) или вакуумную пробирку(и), содержащую(ие) ЭДТА или гепарин. Дайте возможность крови сгуститься (для образцов сыворотки). Центрифугируйте образец для отделения сыворотки от клеток. Образцы можно охлаждать до 2-8 °С на протяжении максимум 5 дней.

Если образцы не использованы на протяжении этого времени, их можно хранить при температуре -20 °С до 30 дней. Избегайте повторных замораживаний и размораживаний.

При проведении анализа в дубле необходимо 0,05 мл образца.

7 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждой лаборатории следует установить свои диапазоны контролей для нормального, граничного и повышенного диапазона значений для мониторинга процедуры анализа. Эти контроли нужно обрабатывать как неизвестные и определять значения в каждой процедуре теста. Контроль качества нужно проводить для того, чтобы можно было проследить за результатами анализа поставляемых реагентов. Подходящие статистические методы нужно использовать также для проверки данных. Существенное отклонение от установленных результатов может указывать на незамеченное изменение в экспериментальных условиях или ухудшение реагентов образца. Для того чтобы выявить причину отклонений, следует использовать свежие образцы.

8 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Разбавитель сыворотки

Разведите концентрат разбавителя сыворотки до 200 мл в подходящем контейнере дистиллированной или неионизированной водой. Храните при температуре 2-8 °С.

2. Промывочный буфер

Разбавьте содержимое промывочного концентрата до объема 1000 мл дистиллированной или неионизированной водой в пригодном для хранения контейнере. Храните при комнатной температуре 2-30°С до 60 дней.

3. Раствор рабочего субстрата

Влейте содержание флакона с меткой «Субстрат А» во флакон с меткой «Субстрат В». Закройте этот флакон желтой крышкой для легкой идентификации. Смешайте и храните при 2-8°С.

Примечание: не используйте рабочий субстрат, если он голубого окраса.

4. Разбавление образца пациента (1/100)

Распределите 0,010 мл (10мкл) каждого образца пациента в 1 мл раствора сыворотки. Накройте, покрутите или смешайте полностью с помощью инверсии. Храните при температуре 2-8°С на протяжении 48 часов.

Примечание: не использовать загрязненные реагенты или реагенты с признаками роста бактерий.

9 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приведите все реагенты, стандарты, контроли и образцы к комнатной температуре (20-27°С).

1. Приготовьте лунки микропланшета для каждой референтной сыворотки, контроля и образца для анализа в дубликаты. Неиспользованные стрипы поместить назад в пакет, запечатать и хранить при 2-8°C.
2. Пипетировать 0,025 мл (25 мкл) соответствующей референтной сыворотки, контроля или разведенного образца в помеченные лунки.
3. Добавить 0,100 мл (100 мкл) раствора биотинилированного реагента ТРО.
4. Покачайте осторожно микропланшет 20-30 сек. для смешивания и накройте.
5. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
6. Удалите содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. Промокните планшетку абсорбирующей бумагой, в случае декантации.
7. Добавьте 350 мкл промывочного буфера, декантируйте (удалите и промойте) или аспирируйте. Повторите эту процедуру два раза, чтоб вместе получилось три промывания. *Может использоваться автоматическое или ручное устройство для промывания. При этом следуйте руководству по эксплуатации производителя для точной процедуры промывания. При использовании бутылки со сдвиганием, наполните каждую лунку при сдвигании контейнера (избегайте воздушных пузырей). Декантируйте промывочный раствор и повторите еще дважды.*
8. Добавьте 0,100 мл (100 мкл) ферментного реагента х-ТРО во все лунки. Всегда добавляйте реагенты в одинаковой последовательности для минимизации разного времени реакции в разных лунках. **Не встряхивать планшет после добавления фермента.**
9. Инкубируйте при комнатной температуре 30 мин.
10. Повторите этапы 6 и 7 как указано выше.
11. Добавьте 0,100 мл (100 мкл) раствора рабочего субстрата во все лунки. Всегда добавляйте реагенты в той же последовательности для минимизации различий во времени реакции между лунками. **Не встряхивать планшет после добавления фермента.**
12. Инкубируйте при комнатной температуре 15 мин.
13. Добавьте 0,50 мл (50 мкл) стоп раствора в каждую лунку и осторожно смешайте 15-20 сек. Добавляйте в том самом порядке.
14. Считайте абсорбцию каждой лунки при 450 нм микропланшетным ридером (используя установленную длину волны 620-630 нм для минимизации колебаний) в течении 30 мин. **Результаты следует считать не позже 30 минут после добавления стоп раствора.**

Примечание: Для проведения повторного анализа образцов с концентрацией больше 500 МЕ/мл, разведите образец дополнительно 1:5 или 1:10 используя оригинальный материал для растворения. Умножьте на фактор разбавления для получения концентрации образца.

10 РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Референтную кривую используют для определения концентрации анти-ТРО в новых образцах.

1. Пометьте абсорбцию, полученную с распечатки микропланшетного ридера, как указано в примере 1.
2. Отметьте точками абсорбцию каждого дубликата стандартной сыворотки против соответствующей концентрации анти-ТРО в МЕ/мл на линейной графической бумаге.
3. Проведите оптимальную кривую через отмеченные точки.
4. Для определения уровня анти-ТРО в неизвестном образце, пометьте объем абсорбции дубликатов каждого неизвестного на вертикальной оси графика, найдите пересекающуюся точку на кривой и считайте концентрацию (в МЕ/мл) с горизонтальной оси графика. В следующем примере среднее значение абсорбции 1,323 (пересекает кривую) при 200 МЕд/мл концентрации анти-ТРО.

Пример 1

Образец	Номер лунки	Абс (А)	Среднее Абс. (В)	Значение (МЕд/мл)
Кал А	A1	0,022	0,026	0
	B1	0,030		
Кал В	C1	0,240	0,244	25
	D1	0,247		
Кал С	E1	0,437	0,430	50
	F1	0,422		
Кал. D	G1	0,795	0,788	100
	H1	0,782		
Кал. E	A2	1,610	1,590	250
	B2	1,572		
Кал. F	C2	2,659	2,600	500
	D2	2,533		
Пац. 1	E2	1,294	1,323	200

	F2	1,351		
--	----	-------	--	--

*Приведенные данные в Примере 1 и графике 1 только для иллюстрации и не могут использоваться для вычисления результатов каждого анализа.

11 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для достоверности результатов следующие критерии должны быть соблюдены:

- Абсорбция калибратора F должна быть $\geq 1,3$.
- Четыре из шести калибраторов должны попадать в установленный диапазон.

12 РИСКИ АНАЛИЗА

12.1 Проведение анализа

- Важно, что бы время реакции для каждой лунки было стабильно. Пипетирование образцов не должно превышать 10 мин. для избегания изменения результатов анализа. Если используется более чем один планшет, необходимо строить еще одну кривую.
- Добавление раствора субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому добавление стоп раствора и субстрата нужно проводить с той самой частотой, чтобы не допускать часовую девиацию во время реакции.
- Планшетный ридер измеряет вертикально. Не дотрагивайтесь дна лунок.
- Не правильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.
- Очень большие концентрации анти-ТРО в образцах пациента могут немедленно загрязнять образцы, следуя этим высоким уровням. Плохие дубликаты указывают на перекрестное загрязнение. Повторите любую пробу, которая показывает больше 3,0 единиц абсорбции в любом образце пациента.
- Образцы, которые загрязнены микробиологически, использовать не нужно.

12.2 Интерпретация

- Если управляемые компьютерные данные сокращения используются для интерпретирования результатов теста, обязательно необходимо, чтобы предсказуемые значения калибраторов не были больше или меньше 10% предписываемых концентраций.
- Наличие аутоантител к ТРО подтверждено когда уровень сыворотки достигает значения 40 МЕ/мл. Клиническая важность результата связанного с анти тиреоглобулиновой деятельностью должна использоваться при оценке тиреоидного состояния. Тем не менее, клинические выводы не должны базироваться только на этом анализе, а также на клиническом состоянии пациента и других результатах анализов.

13 ОЖИДАЕМЫЕ ДИАПАЗОНЫ ЗНАЧЕНИЙ

Для определения ожидаемых результатов анти-ТРО было проведено изучение населения нормального типа. Число (n), среднее значение (x) и стандартное отклонение поданы в таблице 1. Значения больше 40 МЕ/мл считаются позитивными на наличие аутоантител анти-ТРО.

Таблица 1

Ожидаемые значения для тестовой системы анти-ТРО (Ед/мл)

Число	100
Среднее значение	17,6
Стандартное отклонение	10,8
Уровень больше 95%	39,2

Очень важно всегда помнить, что установление предельных норм при использовании метода исследования „нормального” населения зависит от множества факторов: специфичности метода, населения, которое находится под обследованием, точности использования метода аналитиками. В связи с этими причинами, каждая лаборатория должна полагаться на крайние границы ожидаемых результатов, которые установлены производителем до того времени, пока их собственные нормы не будут установлены при использовании метода изучения местного населения.

14 РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точность

Внутри и межтестовая точность системы на определение уровня Анти-ТРО была определена при анализе трех разных уровней сыворотки. Число, среднее значение, стандартное отклонение, и коэффициент изменения для каждого контроля серы отображены в таблице 2 и 3:

Таблица 2
Точность в анализе (значения в МЕ/мл)

Образец	Число	Среднее Значение	Стандартное отклонение	Кoeffициент корреляции
Пул 1	20	25,5	1,5	5,7%
Пул 2	20	120,5	4,6	3,8%
Пул 3	20	352,4	14,8	4,2%

Таблица 3
Точность между анализами (значения в МЕ/мл)

Образец	Число	Среднее Значение	Стандартное отклонение	Кoeffициент корреляции
Пул 1	10	26,5	1,8	6,8%
Пул 2	10	118,5	5,3	4,5%
Пул 3	10	365,4	22,5	6,2%

Как было измерено в 10 экспериментах в дубликаты на протяжении 7 дней.

14.2 Чувствительность

Набор ИФА антител к тиреоидной пероксидазе имеет чувствительность 0.92 МЕд/мл.

14.3 Достоверность

Тест-система DRG на определение анти-ТРО была сравнена с аналогичной системой другого производителя. Для этого были использованы биологические образцы от здоровых и больных пациентов. Среди заболеваний были обнаружены: тиреоидит Хашимото, заболевание Грейвса, тиреоидные узлы и тиреоидная карцинома. Общее число таких примеров – 82. С помощью референтного метода было определено коэффициент корреляции для анти-ТРО ELISA.

Таблица 4

Метод	Среднее значение	Анализ	Кoeff. коррекции
Настоящий	122,9	$y=1,02(x)-5,1$	0,989
Референтный	127,0		

14.4 Специфичность

Взаимодействие с антиядерными антителами, ДНК, антителами к тиреоглобулину и ревматоидному фактору оказалось незначительным.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com