

Код ОКП 939817

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 200 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические
системы»

И. Е. Колосов

«20 февраля 2008 г.»



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«ДС-ИФА-Тирод-анти-ТПО»

Тест-система иммуноферментная для количественного определения
аутоантител к тиреоидной пероксидазе

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС-Тирод-ИФА-анти-ТПО» предназначен для количественного определения уровня аутоантител к тиреоидной пероксидазе (ТПО) в сыворотке крови человека при помощи иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Аутоантитела к ТПО относятся в основном к классу IgG. В сыворотке здоровых людей антитела к ТПО могут содержаться в концентрации до 30 МЕ/мл. Концентрации анти-ТПО выше этого уровня расцениваются как показатель аутоиммунного процесса. Определение анти-ТПО может быть использовано для диагностики аутоиммунных поражений щитовидной железы (диффузный токсический зоб, аутоиммунный тиреоидит).

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах в 48 пробах (41 неизвестная проба, одна проба контрольной сыворотки, пять стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора: необходимо обязательное использование всех калибровочных проб при каждой постановке; набор может быть использован в течение месяца после вскрытия реагентов набора.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

На первой стадии анализа анти-ТПО, содержащиеся в калибровочных и исследуемых пробах, связываются с тироидной пероксидазой, иммобилизованной на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа связавшиеся анти-ТПО взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству анти-ТПО в исследуемом образце.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации анти-ТПО в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация анти-ТПО в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора:

- иммуносорбент – полистироловые 96-луночные разборные планшеты в лунках которых сорбирован нативный антиген тироидной пероксидазы (ТПО) щитовидной железы человека, маркирован «Иммуносорбент» — 1 шт;

- конъюгат – антитела против иммуноглобулина G человека, меченые пероксидазой хрена; прозрачная или опалесцирующая желтого цвета жидкость; маркирован «Конъюгат» — 1 фл. (12,0 мл);

- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по Первому международному стандарту IRP 66/387, содержащие известные количества анти-ТПО; прозрачные или опалесцирующие бесцветные или светло-желтого цвета жидкости;

калибровочный материал может отличаться от заявленного по значениям концентрации анти-ТПО (МЕ/мл), значения концентраций анти-ТПО в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества, маркированы:

- «Калибратор 0» (0 МЕ/мл) - 1 фл. (1,0 мл);
- «Калибратор 1» (30 МЕ/мл) - 1 фл. (1,0 мл);
- «Калибратор 2» (100 МЕ/мл) - 1 фл. (1,0 мл);
- «Калибратор 3» (250 МЕ/мл) - 1 фл. (1,0 мл);
- «Калибратор 4» (500 МЕ/мл) - 1 фл. (1,0 мл)

- контрольная сыворотка с известным содержанием анти-ТПО; прозрачная или опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость; значение концентрации анти-ТПО в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 фл. (1,0 мл);

- раствор для предварительного разведения сывороток; прозрачная или слегка опалесцирующая сине-фиолетового цвета жидкость; маркирован «PPC» - 1 фл. (12,0 мл);

- блок-раствор для рабочего разведения сывороток; прозрачная или слегка опалесцирующая розового цвета жидкость; маркирован «БР» - 1 фл. (12,0 мл);

- промывочный раствор, концентрат; прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании; маркирован «ПР (концентрат x 25)» — 1 фл. (50 мл);

- ТМБ – Субстратный раствор; прозрачная бесцветная жидкость; маркирован «ТМБ-Субстратный раствор» — 1 фл. (12,0 мл);

- серная кислота в концентрации 0,2 моль/л; прозрачная бесцветная жидкость; маркирована «Стоп-реагент/0,2М» - 1 фл. (15,0 мл);

- планшет для предварительного разведения сывороток – 1 шт;

- бланк для построения калибровочной кривой – 1 шт;

- инструкция по применению – 1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

-крышка к полистироловым 96-луночным планшетами;

-одноразовые наконечники;

-пластиковая ванночка для жидких реагентов;

-пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация анти-ТПО в сыворотке крови человека не превышает 2 МЕ/мл.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения анти-ТПО в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «ДС-ИФА-Тирод-анти-ТПО» не превышает 8%.

3.3. Специфичность. Использование высокоочищенного ТПО для сенсбилизации стрипов обеспечивает высокую специфичность анализа.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации анти-ТПО в образцах сыворотки крови при разведении их БР имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1–№4. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» анти-ТПО — соответствие измеренной концентрации анти-ТПО предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №2. Процент открытия составляет от 90 до 110 %.

3.6. Клиническая проверка. Содержание анти-ТПО измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 350 здоровых людей в возрасте от 21 до 45 лет. Измеренная концентрация анти-ТПО не превышала 30 МЕ/мл в 99,2% случаев.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций анти-ТПО, соответствующие нормальным.

4. Меры предосторожности

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. Стоп-реагент представляет собой 0,2 М раствор серной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. исследуемые образцы сывороток крови являются потенциально инфицированным материалом, в котором длительное время могут сохраняться возбудители ВИЧ, парентеральных вирусных гепатитов и других инфекционных заболеваний.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре от 18 до 24 °С;

- термостат для инкубации при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С;

- устройство для промывания планшетов (вошер);

- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. Анализируемые образцы сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

7. Подготовка реагентов для анализа

7.1. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре (от 18 до 24 °С).

7.2. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной**

температуре (от 18 до 24 °С) в закрытом пакете не менее 30 минут. Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

7.3. ПР – рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (согласно таблице № 1). Полученный раствор тщательно перемешать.

7.4. РРС - готов к применению.

7.5. БР - готов к применению.

7.6. Конъюгат – готов к применению.

7.7. Калибровочные пробы - готовы к применению.

7.8. Контрольная сыворотка, готова к применению.

7.7. ТМБ-Субстратный раствор– готов к применению.

7.8. Стоп-реагент - готов к применению.

Необходимое для анализа количество концентрата ПР, конъюгата, и ТМБ - Субстратного раствора в зависимости от числа одновременно используемых стрипов приведено в таблице 1.

Таблица 1

Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов

	Рабочий промывочный раствор		Конъюгат (мл)	ТМБ- Субстратный раствор (мл)
	ПР (конц x25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)		
2	5	120	2,0	2,0
3	10	240	3,0	3,0
4	15	360	4,0	4,0
5	15	360	5,0	5,0
6	20	480	6,0	6,0
7	20	480	7,0	7,0
8	20	480	8,0	8,0
9	20	480	9,0	9,0
10	20	480	10,0	10,0

11	20	480	11,0	11,0
12	20	480	12,0	12,0

8. Проведение анализа.

8.1. Перед проведением ИФА необходимо вставить в рамку нужное количество стрипов.

8.2. Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (PPC). Для этого внести в лунки вспомогательного планшета 90 мкл раствора, добавить 10 мкл сыворотки и тщательно перемешать. При этом фиолетово-синий цвет меняется на зеленовато-голубой. Разведенные сыворотки не хранить!

8.3. Калибровочные пробы и контрольную сыворотку рекомендуется вносить по следующей схеме:

в лунки иммуносорбента А-1, А-2 дозатором пипеточным внести по 100 мкл «Калибратора 0», в лунки В-1, В-2 - по 100 мкл «Калибратора 1», в лунки С-1, С-2 - по 100 мкл «Калибратора 2», в лунки D-1, D-2 – по 100 мкл «Калибратора 3», в лунки Е-1, Е-2 - по 100 мкл «Калибратора 4», в лунки F-1, F-2 - по 100 мкл контрольной сыворотки. Лунки G-1, G-2 оставить для измерения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки иммуносорбента внести по 90 мкл БР, затем по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых сывороток (конечное разведение сывороток 1:100). Исследуемые образцы тестировать в дубликатах. Содержимое лунок тщательно перемешать пипетированием. Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

Планшет закрыть крышкой и выдержать 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

8.4. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 3 раза рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя

промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

8.5. Во все лунки стрипов (кроме G-1, G-2) внести по 100 мкл конъюгата и покрытый крышкой планшет выдержать в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

8.6. Содержимое лунок удалить в ёмкость для сбора инфицированного материала и планшет промыть 5 раз, как в п.8.4.

8.7. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора, выдержать в течение от 20 до 30 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 $^\circ\text{C}$.

8.8. Реакцию остановить добавлением в лунки по 150 мкл стоп-реагента, встряхивать стрипы на шейкере в течение от 10 до 15 секунд и провести учет результатов.

9. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны: 450 нм с настройкой прибора по «воздуху».

Желательно использовать программу спектрофотометра, позволяющую вычитать величину оптической плотности (ОП) в лунках с «Калибратором 0» (A1-A2) из значений ОП всех остальных лунок, если фотометр не позволяет вычитать величину ОП лунок A1-A2, то для расчетов концентраций следует использовать величину разности ОП образца – $\text{ОП}_{\text{A1-A2}}$, где ОП образца – среднее значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, $\text{ОП}_{\text{A1-A2}}$ – среднее значение ОП лунок A1-A2.

10. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с контролем субстрата (G1 и G2) - не более 0,1.

По результатам измерений вычислить средние арифметические значения ОП для дубликатов калибровочных образцов. На трафарете для калибровочных проб в линейных координатах построить калибровочную кривую: ось абсцисс X – концентрации антител к ТПО в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат Y - значения средней ОП калибровочных проб. По калибровочному графику определить концентрацию анти-ТПО в исследуемых сыворотках. Образец, значение ОП для которого выше, чем в наибольшей калибровочной пробе, должен быть протестирован в большем разведении (на БР). В случае дополнительного разведения образца необходимо измеренную концентрацию антител к ТПО умножить на фактор разведения.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций анти-ТПО в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации анти-ТПО в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

Концентрация анти-ТПО больше 30 МЕ/мл, рассматривается как повышенная.

11. Условия хранения и эксплуатации набора

11.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 13 месяцев.

11.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

11.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 месяца при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

- ПР (концентрат х 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

- РРС - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным РРС хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- БР - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным БР хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- Коньюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным коньюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Калибровочные пробы - после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- ТМБ-Субстратный раствор – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ - Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно

закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным Стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

11.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12

Директор ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»
по производству


Г. А. Полянская

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»


профессор Долгов В.В.

200 г.



Подпись В.В. Долгова
удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись: И.О. 25.01.08