

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного определения
концентрации антител к тиреопероксидазе
в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Анти-ТПО – ИФА – БЕЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
X-3968



1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Анти-ТПО – ИФА – БЕСТ» предназначен для иммуноферментного определения концентрации антител к тиреопероксидазе в сыворотке крови человека.

Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и одного контрольного образца при одновременном использовании всех стрипов планшета.

Антитела к тиреопероксидазе (далее Анти-ТПО) – это циркулирующие гетерогенные иммуноглобулины, преимущественно класса G, против фермента, являющегося основным антигенным компонентом микросом. Они участвуют в реализации сложного механизма аутоиммунного поражения щитовидной железы и, следовательно, являются основными маркерами тиреоидных аутоиммунных заболеваний.

Количественное определение содержания Анти-ТПО в сыворотке крови имеет важное значение для диагностики аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, а также при проведении контроля за эффективностью лечения.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения антител к тиреопероксидазе основан на твердофазном непрямом иммуноферментном анализе.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит связывание антител к тиреопероксидазе с тиреопероксидазой, иммобилизованной на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации при добавлении конъюгата происходит связывание антител к IgG, конъюгированных пероксидазой, с антителами к тиреопероксидазе, иммобилизованными в ходе первой реакции.

Количество связавшегося конъюгата выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Степень окрашивания пропорциональна концентрации антител к тиреопероксидазе в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация Анти-ТПО в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «ломающихся» по 1 лунке) с иммобилизованной на внутренней поверхности тиреопероксидазой человека, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы, аттестованные по международно-признанному референсному стандарту Анти-ТПО NIVC 66/387, содержащие известные количества Анти-ТПО – 0; 25; 100; 250; 500;

1000 МЕ/мл*; готовые для использования – 6 фл. по 1,3 мл;

- контрольный образец с известным содержанием Анти-ТПО, готовый для использования – 1 фл., 1,3 мл;
- конъюгат антител к IgG с пероксидазой хрена – 1 фл., 13 мл;
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 фл., 10 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 фл., 12 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

* Концентрации Анти-ТПО в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов.

2.3. Аналитические и диагностические характеристики

Специфичность. Использование высокоочищенной тиреопероксидазы для иммобилизации на планшете обеспечивает высокую специфичность анализа.

Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания Анти-ТПО в одном и том же образце с использованием набора «Анти-ТПО – ИФА – БЕСТ» не превышает 8%.

Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация Анти-ТПО не превышает 5 МЕ/мл.

Клиническая проверка. Концентрация Анти-ТПО, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч у 115 здоровых лиц в возрасте 20–50 лет, не превышала 30 МЕ/мл.

Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации Анти-ТПО, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с компонентами набора

Все компоненты набора являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания

на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реактента на кожу и слизистые необходимо пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.

Обращение с исследуемыми образцами

При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «ИНСТРУКЦИИ ПО МЕРАМ ПРОФИЛАКТИКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРИ РАБОТЕ В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 3.2. настоящей инструкции и согласно МУ-287-113 «МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ДЕЗИНФЕКЦИИ, ПРЕДСТЕРИЛИЗАЦИОННОЙ ОЧИСТКЕ И СТЕРИЛИЗАЦИИ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ» (утв. департаментом госсанэпиднадзора МИНЗДРАВА РФ ОТ 30.12.1998).

3.2. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТР51609-2000).

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

– для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (перекись водорода, дioxлор, хлорамин), в помещениях, где проводят ИФА, приводит к серьезному искажению результатов;

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую

посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

- перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо обрабатывать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с ТМБ;

- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

- Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

- Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

- Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе

промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором необходимо следующее дополнительное оборудование и материалы:

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм;
- термостатируемый шейкер орбитального типа на 650 об/мин, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- промыватель ручной или автоматический;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

- фильтровальная бумага;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 500 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

На один анализ потребуется 10 мкл сыворотки крови человека.

Требования к образцам

Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

Образцы сывороток крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25°C.

6. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа вскрыть упаковку набора, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Вы-

держат все компоненты набора и анализируемые образцы при температуре от 18 до 25°C не менее 30 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°C течение всего срока годности набора

Калибровочные пробы, контрольный образец, конъюгат, раствор тетраметилбензидаина и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения

6.1. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности.

6.2. Подготовка исследуемых образцов

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток. Для этого внести в лунки вспомогательного планшета по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки, тща-

тельно перемешать. При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат.

Хранение: при 18–25°C не более 3 ч.

6.3. Приготовление промывочного раствора

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

Хранение: не более 5 суток при 2–8°C.

6.4. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			Концентрат ФСБ-Т, мл	Дистил. вода, мл
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

6.5. Подготовка раствора тетраметилбензидина

Раствор ТМБ готов к использованию. Исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина. Непосредственно перед использованием отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов).

Утилизировать раствор тетраметилбензи-
дина, оставшийся в ванночке или флаконе по-
сле проведения ИФА (*не сливать во флакон
с исходным раствором*).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ
необходимо использовать только одноразовые
наконечники. Посуду, предназначенную для рас-
твора ТМБ, нельзя отмывать с применением
синтетических моющих средств, поскольку даже
их следы ведут к неконтролируемому окислению
ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополос-
нуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и
тщательно отмыть дистиллированной водой.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.1. Внесение образцов

Внести в дублях, начиная с верхних лунок
первых двух стрипов, по 100 мкл калибровочных
проб 0, 25, 100, 250, 500, 1000 МЕ/мл. В следую-
щую пару лунок внести по 100 мкл контрольного
образца.

В остальные лунки внести в дублях по
90 мкл РРС и по 10 мкл образцов сывороток
крови в предварительном разведении (п. 6.2.),
тщательно перемешать круговыми движениями
наконечника пипетки, таким образом, исследу-
емый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

*Время внесения образцов не должно пре-
вышать 10 мин при использовании всех лунок
планшета.*

7.2. Инкубация

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37°C в течение 30 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.

7.3. Промывка

По окончании инкубации снять лишнюю пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 6.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.4. Внесение конъюгата

В лунки планшета внести по 100 мкл конъюгата (п. 6.4.).

Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.5. Инкубация

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37°C в течение 30 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.

7.6. Промывка

По окончании инкубации промыть планшет как описано выше.

7.7. Внесение ТМБ

Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ (п. 6.5.).

Для внесения раствора тетраметилбензи-дина использовать пластиковую ванночку и одно-разовые наконечники, входящие в состав набора.

7.8. Инкубация

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37°C в течение 15 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.

7.9. Внесение стоп-реагента

Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензи-дина. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

Краткая схема проведения ИФА приведена в приложении 1 в конце настоящей инструкции.

7.10. Проведение измерений

Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме: основ-

ной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин

8. УСЛОВИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ РАБОТЫ НАБОРА

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– соотношение оптических плотностей калибровочных проб: $ОП_0 < ОП_{25} < ОП_{100} < ОП_{250} < ОП_{500} < ОП_{1000}$;

– $ОП_{1000} \geq 1,0$ ед. опт. плотн. (о.е.);

– $ОП_0 \leq 0,1$ о.е.;

– вычисленное по калибровочному графику значение концентрации Анти-ТПО в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

$ОП_0$, $ОП_{25}$, $ОП_{100}$, $ОП_{250}$, $ОП_{500}$ и $ОП_{1000}$ – среднее значение оптической плотности калибровочных проб 0, 25, 100, 250, 500 и 1000 МЕ/мл соответственно.

9. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации Анти-ТПО (ось абсцисс) в калибровочных пробах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждой калибровочной пробы отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

Определить концентрацию Анти-ТПО в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации Анти-ТПО в образце (см. пример 1).

Если концентрация Анти-ТПО в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 1000 МЕ/мл, образец следует предварительно развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), затем повторить анализ в соответствии с инструкцией, начиная с п. 7., и полученный результат умножить на 20.

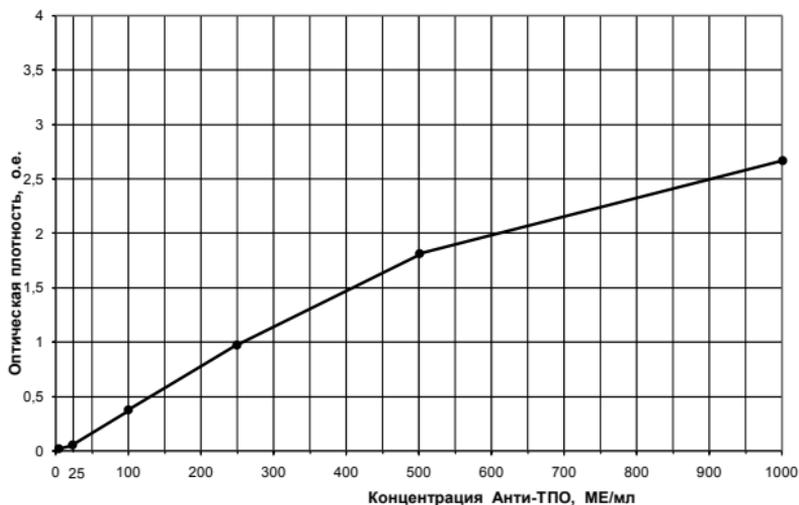


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации Анти-ТПО в калибровочных пробах.

Пример 1

Калибровочная проба, содержащая Анти-ТПО	Значение ОП о.е.	Конц-ция Анти-ТПО (определенная по графику)
1000 МЕ/мл	2,66	–
500 МЕ/мл	1,79	–
250 МЕ/мл	0,97	–
100 МЕ/мл	0,36	–
25 МЕ/мл	0,078	–
0 МЕ/мл	0,011	–
Контрольный образец	0,610	160,9 МЕ/мл
Анализируемый образец	0,972	184,6 МЕ/мл

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации Анти-ТПО в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Набор реагентов следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес.). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

По окончании срока годности набор не использовать.

Замораживание набора не допускается.

Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации Анти-ТПО в контрольном образце.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или сме-

шивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению набора.

11. КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

По вопросам, касающимся качества набора,

обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:
630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. /факс (383) 363-13-46
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-75-41

**Краткая схема проведения ИФА
для набора реагентов
«Анти-ТПО – ИФА – БЕСТ»**

*Использовать только после внимательного
ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 100 мкл контрольного образца и калибровочных проб в дублях;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов в дублях.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

15.04.14.

ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Международные сертификаты
ISO 9001 и ISO 13485

НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА

Вирусные гепатиты А, В, С, D, Е, G, ТТ;
ВИЧ-инфекция; ИППП; ТОРСН-инфекции;
герпесвирусные инфекции; беременность;
аутоиммунные, системные, паразитарные,
желудочно-кишечные заболевания;
гормоны; опухолевые и кардиомаркеры;
цитокины, аллергены и др.

***Точная диагностика –
эффективное лечение!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru