

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО ТИРЕОЇДНОЇ ПЕРОКСИДАЗИ МЕТОДОМ ІФА

Anti-Thyroperoxidase (Anti-TPO) Test System

Кат. №: 1125-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 4



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВСТУП

Використання за призначенням: Кількісне визначення аутоантитіл тиреоїдної пероксидази (ТПО) в сироватці або плазмі за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричний.

Вимірювання аутоантитіл ТПО може допомогти в діагностиці деяких захворювань щитовидної залози, таких як Хашимото і Грейва, а також нетоксичного зобу.

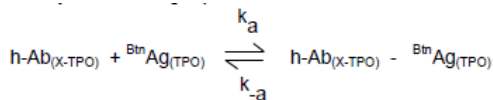
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Метод послідовного ІФА типу «Сендвіч» (ТИП 1)

Реагенти, необхідні для послідовного аналізу ІФА, включають іммобілізований антиген, циркулююче аутоантитіло і специфічне антитіло, ферментно-пов'язане. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час тесту на поверхні лунки мікропланшета при взаємодії стрептавідину, нанесеного в лунку і додавання ззовні антигену тиреоїдної пероксидази.

При змішуванні біотинильованого антигену і сироватки, що містить аутоантитіла, відбувається реакція між антигеном і антитілом з утворенням імунного комплексу. Взаємодія описується наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ag}_{(\text{TPO})}$ = Біотинильований антиген (постійна кількість)

$h\text{-Ab}_{(X\text{-TPO})}$ = аутоантитіло людини (змінна кількість)

$\text{Ab}_{(X\text{-TPO})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ag}_{(\text{TPO})}$ = імунний комплекс (змінна кількість)

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

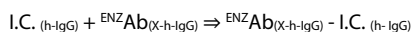
Одночасно комплекс осідає в лунці завдяки реакції високої спорідненості між стрептавідином і біотинильованим антигеном. Ця взаємодія показана нижче:

$h\text{-Ab}_{(X\text{-TPO})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ag}_{(\text{TPO})} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ – іммобілізований комплекс

Стрептавідин_{CW} = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею.

Після інкубації лунки добре промивають, щоб відокремити незв'язані компоненти шляхом аспірації та/або декантації. Ферментно-пов'язані видиспецифічні антитіла (анти-IgG) потім додають в лунки. Ці кон'югати зв'язуються з утвореним імунним комплексом.



$I.C. (h\text{-IgG})$ = Іммобілізований імунний комплекс (змінна величина)

$\text{ENZAb}_{(X\text{-h-IgG})}$ = кон'югат фермент-антитіло (постійна величина)

$\text{ENZAb}_{(X\text{-h-IgG})} - I.C. (h\text{-IgG})$ = Ag-Ab комплекс (змінна величина)

Ферментний кон'югат анти-h-IgG, який зв'язується з імунним комплексом при другій інкубації, відділяється від матеріалу, який не зреагував, на стадії промивки. Активність ферменту в цій фракції прямо пропорційна концентрації антитіл в зразок. Використовуючи декілька різних референтних

сироваток з відомою активністю антитіл, будується калібрувальна крива, з якої визначається активність невідомого антитіла.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори анти-ТПО - 1 мл (мл)/флакон

6 флаконів референтної сироватки для анти-ТПО з концентраціями 0 (A), 25 (B), 50 (C), 100 (D), 250 (E) і 500 (F) МО/мл (IU/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.

Примітка: Калібратори на основі людської сироватки були відкалібровані при використанні 1-ого Міжнародного еталонного препарату, який аналізували відносно Стандарту 66/387 Ради з медичних досліджень (MRC) для анти-тиреоїдної мікросомії.

B. Біотиновий Реагент ТПО - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон біотинильованого ТПО, стабілізованого в буферній матриці. Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Ферментний реагент анти-ТПО - 13 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон кон'югату анти-людського IgG-пероксидаза хрому (HRP), стабілізованого в буферній матриці. Консервант був доданий. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Розчинник сироватки - 20 мл (мл)

Один (1) флакон концентрату розчинника сироватки, який містить буферні солі і барвник. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

F. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

G. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

I. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°C).

J. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор з можливістю доставляти об'єми 0.0101 мл (мл) (10.1 мкл (μl)), 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) і 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсер (и) для повторюваних поставок об'ємом 0.100 і 0.350 мл (мл) (100 і 350 мкл (μl)) з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Тестова пробірка(и) для розведення зразків пацієнта.
9. Таймер.
10. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики.

Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, HHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками мають бути кров, сироватка або плазма, дотримуватися звичайних застережних заходів при заборі зразків крові методом венепункції. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримували терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (мг)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.05 мл (мл) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контролі повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Розчинник сироватки

Розвести розчинник сироватки до 200 мл (мл) в підходящому контейнері дистильованою або деіонізованою водою. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

2. Промивний буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (мл) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

3. Робочий розчин субстрату - Стабільний протягом одного (1) року. Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C (°C).

4. Розведення Зразка Пацієнта (1/100)

Додати 0.0101 мл (мл) (10.1 мкл (μl)) кожного зразка пацієнта до 1 мл (мл) (1000 мкл (μl)) розріджувача сироватки. Накрити кришкою і змішати на вортексі або ретельно перемішати перевертанням. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C) протягом до сорока восьми (48) годин.

Зауваження 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

****Процедуру тестування повинна виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Додайте піпеткою по 25 мкл (μl) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) Біотинового Реагенту ТПО.
4. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
5. Інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.

6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
7. Додайте 350 мкл (μl) промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.

8. Додайте по 100 мкл (μl) Ферментного реагенту х-ТПО у кожну лунку. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТУ

9. Накрити і інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
10. Видаліть вміст мікропланшета декантацією або аспірацією. Якщо дескантуєте, протріть пластину насухо папером.
11. Додайте 350 мкл (μl) буфера для промивання (див. Розділ підготовки реагентів), декантуйте або аспіруйте. Повторіть два (2) додаткові рази для загальної кількості три (3) промивання. Можна використовувати автоматичний або ручний вошер для миття пластин. Дотримуйтесь інструкцій виробника щодо правильного використання. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнюйте кожну лунку, стискаючи пляшку (уникаючи бульбашок повітря), щоб внести розчин для промивання. Видаліть розчин і повторіть два (2) додаткові рази.

12. Додайте по 100 мкл (μl) Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

13. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
14. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл (μl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
15. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Для повторного аналізу зразків з концентрацією більше 500 МО/мл (IU/ml) розбавити зразок додатково 1:5 або 1:10 за допомогою оригінального матеріалу для розведення. Помножити на коефіцієнт розбавлення для отримання концентрації зразка.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації ТПО в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації ТПО в МО/мл (IU/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте концентрації ТПО в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.323 перетинає стандартну криву при 200 МО/мл (IU/ml) (див. мал.1)

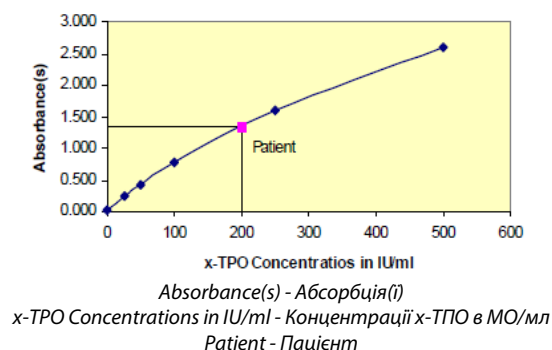
Примітка: Програмне забезпечення для обчислення даних комп'ютера, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для обчислення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід перевірити перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація МО/мл (IU/ml)
Калібратор А	A1	0.022	0.026	0
	B1	0.030		
Калібратор В	C1	0.240	0.244	25
	D1	0.247		
Калібратор С	E1	0.437	0.430	50
	F1	0.422		
Калібратор D	G1	0.795	0.788	100
	H1	0.782		

Калібратор E	A2	1.610	1.590	250
	B2	1.572		
Калібратор F	C2	2.659	2.600	500
	D2	2.533		
Пацієнт	E2	1.294	1.323	200
	F2	1.351		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність Калібратора «F» повинна бути ≥ 1.8 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступна на запит від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Дуже висока концентрація анти-ТПО в зразках пацієнтів може забруднити зразки відразу ж після цих екстремальних рівнів. Погані дублі вказують на перехресне забруднення. Повторіть аналіз будь-якого зразка, який має ОЩ більше 3.0 одиниць.
10. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
11. Дотримуватися всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
12. Важливо є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
13. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для тест-системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними

зразками сироватки та тест-реактивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імуноферментних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних аналізів» Clin. Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні поєднуватися з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.

4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
5. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації. Наявність аутоантитіл до ТПО підтверджується коли рівень сироватки перевищує 40 МО/мл (IU/ml). Клінічна значущість результатів, у поєднанні з активністю анти-тиреоглобуліну, повинні бути використані в оцінці стану щитовидної залози. Проте клінічні висновки не повинні бути виключно на основі цього тесту, а як доповнення до клінічних аналізів пацієнта та інших відповідних досліджень.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Вивчення звичайного населення проводилося для визначення очікуваних значень для тестової системи анти-ТПО AccuBind®. Кількість (N), Середнє (x) і стандартне відхилення (σ) наведені в таблиці 1. Значення понад 40 МО/мл (IU/ml) вважаються позитивними на наявність анти-ТПО аутоантитіл.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для тесту ТПО

Кількість	100
Середнє	17.6
Стандартне відхилення	10.8
Верхня 95% (+2 σ) межа	39.2

Важливо мати на увазі, що створення очікуваного діапазону значень для нормального населення залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення і точності методу в руках оператора. З цих причин кожна лабораторія повинна орієнтуватися на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору ТПО всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (МО/мл (IU/ml))

Зразок	N	x	σ	C.V., %
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

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами* (МО/мл (IU/ml))

Зразок	N	x	σ	C.V., %
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

*Вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

14.2 Чутливість

Анти-ТПО AccuBind® ІФА має чутливість 0.92 МО/мл (IU/ml). Чутливість була отримана при визначенні варіабельності калібратора "0" МО/мл (IU/ml) і з використанням 2 σ статистики (95% точності) для розрахунку мінімальної дози.

14.3 Точність

Тест-систему ІФА Анти-ТПО AccuBind® порівнювали з еталонним методом. Були використані зразки нормальних і хворобливих станів населення. Хворобливі стани: Тиреоїдит Хашимото, хвороба Грейвса, вузли щитовидної

залози, а також рак щитовидної залози. Загальна кількість таких зразків була 82. Отримані дані представлені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	122.9	$Y=1.02(x) - 5.1$	0.989
Метод порівняння	127.0		

14.4 Специфічність

Інтерференція від ANA, ДНК, тиреоглобуліну (ТРО) і ревматоїдних антитіл виявилася незначною у системі аналізу.



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
100 North Pointe Dr.
Lake Forest, CA 92630 - USA
Phone: 949.951.2665
Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
100 Норд Поїнт Драйв
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США
Тел.: 949.951.2665
Факс: 949.951.3539
www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

