



Набор для определения АНТИТЕЛ ДО ТИРОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ

Кат. № : 101-4114
Количество тестов : 96
Производитель : DRG, (США)

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

Методика от 27-03-2006

НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный анализ предназначен для количественного определения антител до тироидной пероксидазы (**Anti-TPO**) в человеческой сыворотке или плазме. Измерение ТРО помогает при определении диагноза некоторых тироидных заболеваний. Среди них заболевания Гашимото и Грейва, нетоксический зоб.

ПРИНЦИП

Необходимы реагенты для этого анализа: иммобилизованный антиген, циркулирующее автоантитело и фетментосвязанные 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 тироидной пероксидазы. При смешивании биотинилированного антигена и сыворотки, которая содержит автоантитело, образуется как результат реакции антигена и антитела, иммунный комплекс. Это взаимодействие проиллюстрировано на следующем уравнении:

РЕАГЕНТЫ

1) Калибраторы Anti-TPO – 1.0 мл/фл.

Шесть (6) флаконов для уровней Anti-TPO 0 (А), 25 (В), 50 (С), 100 (D), 250 (Е), 500 (F) МЕ/мл. Консервант додан. Хранить при 2-8°C.

Примечание: Калибраторы на основании человеческой сыворотки были калиброваны с использованием эталонного препарата, который был проверен Международным стандартом 66/387 на анти tiroидные микросомы.

2) Конъюгат ТРО Biotin – 13 мл/фл.

Один флакон, содержащий антиген биотинилированной тироидной пероксидазы в буферной матрице. Консервант додан. Хранить при температуре 2-8°C.

3) Конъюгат энзимный антиген – 13 мл/фл.

Один флакон, содержащий конъюгаты античеловеческой IgG пероксидазы хрена в буфере. Консервант додан. Хранить при температуре 2-8°C.

4) Микропланшет с ячейками, покрытыми стрептавидином, 96 лунок.

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

5) Концентрат разбавителя сыворотки – 20 мл.

Один флакон, содержащий содержащий разбавитель сыворотки, содержащий буферные соли и краситель. Хранить при 2-8°C.

6) Концентрат промывочного раствора – 20 мл.

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

7) Субстрат А – 7,0 мл/фл. Одна бутылка, содержащая ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.

8) **Субстрат В – 7,0 мл/фл.** Одна бутылка, содержащая перекись водорода (H₂O₂) в буфере. Хранить при 2-8°C.

9) **Стоп раствор – 8,0 мл/фл.** Одна бутылка, содержащая сильную кислоту (1N HCl) в буфере. Хранить при 2-8°C.

10) Инструкция

Замечание 1: не используйте реагенты после окончания срока пригодности.

Замечание 2: вскрытые реагенты стабильны 60 дней при 2-8°C.

Замечание 3: выше перечисленные реагенты предназначены только для единственной микропланшеты на 96 лунок.

Необходимые, но не поставляемые.

1. Пипетки, способностью внесения объема 10 мкл и 25 мкл с точностью более чем 1,5%.
2. Диспенсер для повторного внесения объема 0,100 мл и 0,300 мл с точностью более чем 1,5%.
3. Микропланшетный промыватель или сдавливающая бутылка (по возможности).
4. Микропланшетный ридер с длиной волны при 450 нм и 620 нм.
5. Абсорбирующая бумага для вытирания ячеек.
6. Пластиковая обертка или микропланшетный накрыватель для шага инкубации.
7. Вакуумный аспиратор (по возможности) для шага промывания.
8. Таймер.
9. Материалы контроля качества.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для диагностики “in vitro”.

Не для внутреннего или внешнего применения на людях или животных.

С реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфицированными.

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. Описание лабораторных процедур поведения с продуктами крови можно найти в Центре Контроля заболеваний.

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 гелиевых барьеров. Дайте возможность крови стуститься. Центрифугируйте образец для отделения сыворотки от клеток. Образцы можно охлаждать до 2-8 °C на протяжении максимум 5 дней. Если образцы не использованы на протяжении этого времени, их можно хранить при температуре -20 °C до 30 дней. Избегайте повторных замораживаний и размораживаний. При проведении повторного анализа необходимо 0,100 мл образца.

ПОДГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1) Разбавитель сыворотки

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

2) Промывочный буфер

Разбавьте содержимое моющего концентрата до объема 1000 мл дистиллированной или неионизированной водой в пригодном для хранения контейнере. Храните при комнатной температуре 20-27⁰С до 60 дней.

3) Рабочий раствор субстрата

Влейте содержание флакона с меткой «Субстрат А» во флакон с меткой «Субстрат В». Смешайте и храните при 2-8⁰С. Используйте в течении 60 дней. Или для более длительного периода использования определите количество необходимого реагента и приготовьте смешиванием равных пропорций субстрата А и субстрата В. Например, добавьте 1 мл субстрата А и 1 мл В в восемь стрипов. (несколько избыточное количество раствора приготовлено).

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

4) Разбавление образца пациента

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.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Приведите все реагенты, стандарты, контроли и образцы к комнатной температуре (20-27⁰С).

1. Приготовьте ячейки микропланшета для каждого стандарта сыворотки, контроля и образца для анализа в дубликате. Не использованные стрипы вставьте назад в алюминиевый пакет, запечатайте и храните при 2-8⁰С.
2. Пипетируйте 0,025 мл (25 мкл) соответствующего стандарта сыворотки, контроля или образца в помеченные ячейки.
3. Добавьте 0,100 мл (100 мкл) раствора ТРО биотинилированного конъюгата.
4. Свихрируйте микропланшет осторожно 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 300 мкл моющего буфера, декантируйте (спустите и промокните) или аспирируйте. Повторите это 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 сдавливанием, наполните каждую ячейку при сдавливании контейнера (избегайте воздушных пузырей). Декантируйте промыватель и повторите еще дважды.
8. Добавьте 0,100 мл (100 мкл) раствора энзима анти-h-IgG конъюгата во все лунки. Всегда добавляйте реагенты в одинаковой последовательности для минимизации разного времени реакции в разных лунках.
9. Покачайте микропланшет осторожно 20-30 сек. для смешивания и накройте пластиковой оболочкой. Инкубируйте при комнатной температуре 30 мин.
10. Повторите этапы 6 и 7.
11. Добавьте 0,100 мл (100 мкл) рабочего субстрата во все лунки. Всегда добавляйте реагенты в той же последовательности для минимизации различий во времени реакции между лунками.
12. Инкубируйте при комнатной температуре 15 мин.
13. Добавьте 0,50 мл (50 мкл) стоп раствора в каждую ячейку и осторожно смешайте 15-20 сек. Добавляйте в том самом порядке.
14. Считайте абсорбцию каждой ячейки 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.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждой лаборатории следует установить свои диапазоны контролей при гипотиреоидных, эутиреоидных и гипертиреоидных показателях 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 незаметное изменение в экспериментальных условиях или ухудшении реагентов образца. Для того чтобы выяснить причину отклонений, следует использовать свежие образцы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кривую отношения 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 МЕ/мл концентрации анти-ТРО.

Пример 1

Образец	Номер ячейки	Абс (А)	Среднее Абс. (В)	Значение (МЕ/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		

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

Q.C. ПАРАМЕТРЫ

Для достоверности результатов, следующие критерии должны приниматься:

- Абсорбция калибратора 0 нг/мл должна быть > 1,3

- Четыре из шести калибраторов должны попадать в установленный диапазон.

ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

А. Проведение анализа

- Важно, что бы время реакции для каждой ячейки 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, что бы не допускать часовую девиацию во время реакции.
- Планшетный ридер измеряет вертикально. Не дотрагивайтесь дна ячеек.
- Не правильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.
- Очень большие концентрации анти-TPO в образцах пациента могут немедленно загрязнять пробы следуя этим высоким уровням. Плохие дубликаты указывают на перекрестное загрязнение. Повторите любую пробу, которая показывает больше 3,0 единиц абсорбции в любом образце пациента.
- Пробы, которые загрязнены микробиологически, использовать не нужно.

В. Интерпретация

- Если управляемые компьютерные данные сокращения используются для интерпретирования результатов теста, обязательно не обходимо чтобы предсказуемые значения калибраторов не были больше или меньше 10% предписываемых концентраций.
- Наличие авто антител к TPO подтверждено когда уровень сыворотки достигает значения 40 МЕ/мл. Клиническая важность результата связанного с анти тироглобулиновой 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.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для определения ожидаемых результатов анти-TPO 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 авто антител анти-TPO.

Таблица 1

Ожидаемые значения для иммуносорбентной тестовой системы анти-TPO

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.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Точность

Внутри и между тестовая точность тестовой системы на определение уровня Анти-TPO 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

Внутри тестовая точность (значения в МЕ/мл)

Образец	Число	Ср.Знач.	Ст.отклонен.	Коеф.кор
Низкий	20	25,5	1,5	5,7%
средний	20	120,5	4,6	3,8%
Высокий	20	352,4	14,8	4,2%

Таблица 3

Между тестовая точность (значения в МЕ/мл)

Образец	Число	Ср.Знач.	Ст.отклонен.	Коеф.кор
Низкий	10	26,5	1,8	6,8%
средний	10	118,5	5,3	4,5%
Высокий	10	365,4	22,5	6,2%

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

Правильность

Микропланшета фирмы DRG на определение анти-TPO была сравнена с аналогической микропланшетой фирмы ELISA. Для этого были использованы биологические образцы от здоровых и больных пациентов. Среди заболеваний были обнаружены: тиреоидис Гашимото, заболевание Грейвса, тиреоидные наросты и тиреоидная карцинома. Общее число таких примеров – 82. С помощью референтивного метода было определено коэффициент корреляции для анти-TPO ELISA.

Таблица 4.

Метод	Ср.Знач.	Анализ	Коеф.кор
этот метод	122,9	$y=1,02(x)-5,1$	0,989
Референтный	127,0		

Чувствительность

Антитиреоидная пероксидаза TPO ELISA имеет чувствительность 1,5 МЕ/мл.

Специфичность

Взаимодействие с ANA, DNA, антителами тиреоглобулина и ревматоида было выявлено как незначительное.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола,97,
 г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 77 51 22
 Тел/факс: (0342) 77 56 12
 E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com