ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЕ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ предназначен для определения концентрации аутоантител к тиреопероксидазе (анти-ТПО) в сыворотке крови человека методом иммунорадиометрического анализа. Набор предназначен для применения только in vitro.

1.2 Тиреопероксидаза (ТПО) – ключевой компонент гормонпродуцирующей системы щитовидной железы. Анти-ТПО – это патологические иммуноглобулины, которые имеют высокое сродство к ТПО и продуцируются в организме при аутоиммунных тироидитах. Количественное определение концентрации анти-ТПО в крови человека необходимо для диагностики хронического лимфоматозного тироидита (тироидит Хашимото), а также послеродового (скрытого) аутоиммунного тироидита, подострого тироидита, диффузного токсического и эндемического зоба, аденомы и рака щитовидной железы.

2.1 Состав набора:

- [^{125}I]-белок А – жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 33 мл, общая активность (90-300) кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованным авидином, готовы к использованию, 100 шт.;
- шесть калибровочных проб в диапазоне концентраций анти-ТПО (0; 30-1800) МЕ/мл (точные значения концентраций анти-ТПО указываются на этикетках флаконов) – жидкие препараты, готовы к использованию, 6 флаконов по 0,5 мл. Калибровочные пробы анти-ТПО откалиброваны относительно международного стандартного образца № 66/387 (NIBSC, Великобритания);
- контрольная сыворотка (КС) – лиофилизованный из объема 0,25 мл препарат, содержащий известное количество анти-ТПО (диапазон концентраций анти-ТПО указывается на этикетке), 1 флакон;
- биотин-ТПО – жидкий препарат, готов к использованию, 2 флакона по 16,5 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 100 мл;
- концентрат промывочного раствора (КПР) – жидкий препарат, 1 флакон, 50 мл.

Б.2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 43 неизвестных проб, 6 калибровочных проб и 1 пробы КС, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 3 ч.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.4 Диапазон определяемых концентраций анти-ТПО (10-1800) МЕ/мл.

2.5 Принцип работы набора основан на методе твердофазного прямого иммунорадиометрического анализа (ИРМА).

В пробирки, покрытые авидином, на первой стадии вносятся разбавленные пробы сыворотки крови пациента, контрольная сыворотка или калибровочные пробы, а затем добавляется биотин-ТПО (биотинилированная тиреопероксидаза). Анти-ТПО, присутствующие в сыворотке крови человека, связываются с биотин-ТПО, образовавшийся комплекс биотин-ТПО···анти-ТПО связывается с иммобилизованным на пробирках авидином. Неспецифические иммуноглобулины, не вступившие в реакции, удаляются путем промывки.

На второй стадии в пробирки вносится белок А, меченный йодом-125. В ходе последующей инкубации протекает реакция связывания адсорбированных анти-ТПО с [^{125}I]белком А. Не вступивший в реакцию [^{125}I]белок А удаляется путем промывки.

Концентрацию анти-ТПО в исследуемых пробах сыворотки крови человека определяют по калибровочному графику зависимости активности связанного [^{125}I]-белка А от концентрации анти-ТПО в калибровочных пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [^{125}I]-белок А является источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [^{125}I] – 60,1 сут.

При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее – РВ) согласно требованиям Санитарных норм и правил «Требования к радиационной безопасности», Гигиенического норматива «Критерии оценки радиационного воздействия», утвержденных Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.12.2012 г. № 213, с дополнением, утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.12.2013 г. № 137.

ВНИМАНИЕ! Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с РВ, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Запрещается при работе с РВ иметь на рабочем месте постороннее оборудование и личные вещи.

Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с РВ.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать гемоконтактные инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [2], [3], [4], [5]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [6].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Все радиоактивные отходы, образованные в процессе использования набора собираются, хранятся и удаляются в соответствии с требованиями [8].

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

4.2 Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания, не пригодны для анализа.

4.3 Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- температура в помещении, где проводится анализ, должна быть (18-25) °С;
- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- не допускается использование реагентов с нарушением герметичности упаковки;
- использовать только новые наконечники для внесения каждого образца и реагента;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- гамма-счетчик колодезного типа, позволяющий измерять активность изотопа [^{125}I];
- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- вихревой смеситель;
- водоструйный насос;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,02 до 5,00 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- пробирки пластмассовые вместимостью (3-5) мл с пробками;
- штатив для пробирок;
- колба плоскодонная вместимостью 1000 мл;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная или деионизованная;
- перчатки хирургические резиновые;
- дезинфицирующие средства.

6 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

6.1 Образцы сывороток крови, в том числе полученных с помощью активатора свертывания крови (в комплексе с разделяющим гелем или без него), могут храниться до анализа не более трех суток при температуре (2-8) °С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре ниже минус 20 °С в течение трех месяцев, при температуре минус 70 °С в течение двух лет. Не использовать сыворотки, которые замораживались/размораживались более двух раз.

6.2 Размораживание образцов сывороток проводить при температуре (18-25) °С. Образцы тщательно перемешать пипетированием в течение не менее 1 мин для достижения однородности.

6.3 Образцы, содержащие агрегаты и осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 1900 g (2500-3000 об/мин).

6.4 Исследуемые образцы сыворотки крови следует проверять на остаточную активность радионуклидов, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1 Перед использованием выдержать компоненты набора и анализируемые образцы сывороток крови при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

7.2 Хранение реагентов после вскрытия упаковки

Флаконы с реагентами закрывать крышками сразу после использования, предупреждая их контаминацию.

В ходе анализа допускается хранение реагентов в течение 8 ч при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

Все неиспользованные компоненты набора хранить в плотно закрытой первичной упаковке при температуре (2-8) °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

7.3 Приготовление промывочного раствора (разведение в 20 раз)

Внести в колбу плоскодонную вместимостью 1000 мл с помощью мерного цилиндра 950 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке.

Приготовленный промывочный раствор может храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

7.4 Во флакон, содержащий лиофилизованную контрольную сыворотку, внести 0,25 мл дистиллированной воды. Через 10 мин осторожно перемешать содержимое флакона до полного растворения препарата, избегая образования

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

пены. При вскрытии и растворении необходимо следить, чтобы на колпачке не осталось сухого вещества.

Раствор контрольной сыворотки может храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

7.5 Разведение контрольной сыворотки и исследуемых проб сыворотки крови человека

7.5.1 Подготовить пластмассовые пробирки (не из набора) для разведения контрольной сыворотки и исследуемых проб сыворотки крови человека.

7.5.2 Внести в соответствующие пробирки (на дно пробирок) по 0,025 мл (25 мкл) раствора контрольной сыворотки или исследуемых проб сыворотки крови человека.

7.5.3 Внести во все пробирки по 1,0 мл (1000 мкл) РРС и перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя.

Разведенная контрольная сыворотка и исследуемые пробы сыворотки крови человека могут храниться при температуре (2-8) °С в течение 3 сут.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Пробирки полистирольные с иммобилизованным авидином маркировать следующим образом (в дубликатах):

B_0-B_5 – для калибровочных проб анти-ТПО;

$B_{КС}$ – для КС;

B_X – для исследуемых проб сыворотки крови человека.

8.2 В пробирки B_0-B_5 внести по 0,025 мл (25 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $B_{КС}$ внести по 0,025 мл (25 мкл) предварительно разведенной по п.7.5 КС. В пробирки B_X внести по 0,025 мл (25 мкл) предварительно разведенных по п.Б.7.5 исследуемых сывороток крови человека.

8.3 Во все пробирки внести по 0,3 мл (300 мкл) биотин-ТПО.

8.4 Содержимое пробирок инкубировать в течение 1 ч при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок при температуре (18-25) °С.

8.5 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса.

8.6 Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора (п.7.3). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.

8.7 Во все пробирки внести по 0,3 мл (300 мкл) [^{125}I]-белка А.

8.8 Содержимое пробирок инкубировать в течение 1 ч при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний в мин) на приборе для встряхивания пробирок при температуре (18-25) °С.

8.9 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.10 Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора (Б.7.3). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса.

После промывки в пробирках не должно оставаться следов красителя.

8.11 Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин.

8.12 Последовательность операций анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательность операций анализа

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций					
	Калибровочные пробы, разведенные КС и исследуемые сыворотки крови человека, мл	Биотин-ТПО мл	Инкубировать 1 ч при постоянном встряхивании при температуре (18-25) °С	Тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор мл	Сразу удалить промывочный раствор с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.
B_0-B_5	0,025	0,3			2	
$B_{КС}$	0,025	0,3			2	
B_X	0,025	0,3			2	

Продолжение таблицы 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций				
	[^{125}I]-белок А, мл	Инкубировать 1 ч при постоянном встряхивании при температуре (18-25) °С	Тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор мл	Сразу удалить промывочный раствор с помощью водоструйного насоса.
B_0-B_5	0,3			2	
$B_{КС}$	0,3			2	
B_X	0,3			2	
Измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин					

9 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

9.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [^{125}I] для каждой пары пробирок, в имп/мин. Из полученных значений скоростей счета вычесть среднее арифметическое значение скорости счета в пробирках B_0.

9.2 Рассчитать величину $(Bi-B_0)/(B_5-B_0)\times100$, в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки крови человека, где Bi – среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках B_1-B_5, $B_{КС}$ и B_X.

9.3 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения $(Bi-B_0)/(B_5-B_0)\times100$, в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций анти-ТПО, в МЕ/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.4 Определить по калибровочному графику содержание анти-ТПО, в МЕ/мл, в КС и исследуемых образцах сыворотки крови человека.

При определении содержания анти-ТПО фактор разведения не учитывается, так как он учтен при построении калибровочного графика.

9.5 Если концентрация анти-ТПО в исследуемом образце выходит за пределы калибровочного графика, образец следует развести РРС, входящим в состав набора.

Следует иметь в виду, что из-за гетерогенности аутоантител к ТПО результаты, полученные в разбавленных образцах, могут не подчиняться линейной зависимости.

10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

10.1 Чувствительность

Минимальная концентрация анти-ТПО, определяемая с помощью набора, составляет не более 10 МЕ/мл.

10.2 Специфичность

Использование высокоочищенной ТПО для биотинилирования обеспечивает высокую специфичность анализа.

При выполнении анализа возможна интерференция гетерофильными антителами в пробе пациента. У пациентов, имеющих постоянный контакт с животными или проходивших иммунотерапию или диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или их фрагментов, могут вырабатываться антитела (т.е.HAMA), которые влияют на результат иммунного анализа. Влияние этих антител может привести к получению ошибочных результатов. Тщательно проверяйте результаты анализов пациентов с подозрением на наличие этих антител.

10.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации анти-ТПО в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием анти-ТПО не превышает 8 %.

10.4 Тест на «открытие»

Соответствие значений измеренной и расчетной концентраций анти-ТПО в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы C_4 составляет (85-115) %.

10.5 Клиническая проверка набора

При использовании набора ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ в 98 % сывороток крови человека концентрация анти-ТПО не превышает 50 МЕ/мл. Значения концентраций выше 150 МЕ/мл считаются патологическими, пациенты с результатами в диапазоне (50-150) МЕ/мл нуждаются в динамическом наблюдении.

Приведенные значения являются ориентировочными. Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций анти-ТПО, соответствующие норме для обследуемого контингента и региона.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Результаты определения должны быть интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данных других тестов и иной подходящей информации.

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1 Набор должен храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

11.2 Срок годности набора – 60 суток.

11.3 Определение концентрации анти-ТПО с помощью набора ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ проводят в сыворотке крови человека.

Образцы сыворотки крови хранят при температуре (2-8) °С, если анализ проводят в течение 24 ч после взятия крови. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре не менее минус 20 °С в течение более длительного времени – не более 3 месяцев (допускается только двукратное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

11.4 Исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови следует проверять на остаточную активность радионуклидов, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

11.5 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

11.6 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru