УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Здравоохранения
Республики Беларусь

_____ В.Е.Шевчук
"05" 11 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ К ТИРОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЕ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ТироидИФА-атТПО
Комплект 1

СП ООО "Фармлэнд",
Генеральный директор

_____ В.В.Голынников
"12" 11 2007 г.

2008

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

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для количественного определения концентрации аутоантител к тироидной пероксидазе в сыворотке крови человека "in vitro" методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 Аутоантитела (АТ) к тироидной пероксидазе (ТПО) относятся в основном к иммуноглобулинам класса G и реже — к иммуноглобулинам класса М. ТПО является ферментом, играющим ключевую роль в процессе синтеза тироидных гормонов. В сыворотке крови здоровых лиц АТ к ТПО могут содержаться в концентрации до 30 Ед/мл. Превышение этого порога свидетельствует об аутоиммунном процессе, как правило, приводящем к нарушению функции щитовидной железы в основном за счет снижения секреции тироксина. Определение АТ к ТПО в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики аутоиммунных тиреоидных заболеваний (идиопатическая микседема, тиреоидит Хашимото, диффузный токсический зоб).

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 комплект
Калибровочная проба C_0*	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_1*	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_2*	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_3*	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_4*	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_5*	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Контрольная сыворотка	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Конъюгат антител против IgG человека с пероксидазой (Конъюгат Е)	1 флакон; 14 мл
Аналитический буферный раствор (Буферный раствор А)	1 флакон; 14 мл
Буферный раствор для разведения образцов сыворотки крови (Буферный раствор Д)	1 флакон; 50 мл
Концентрированный буферный раствор для промывания лунок (Буферный раствор Р)	2 флакона по 14 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ)	1 флакон, 14 мл
Стоп-реагент	1 флакон; 14 мл
Закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки	1 пакет
*Значения концентрации АТ к ТПО в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов.	

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

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения оптической плотности (ОП) раствора ТМБ). Всего – 96 определений при использовании всех стрипов одновременно.

Набор рассчитан на 4 постановки иммуноферментного анализа: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки).

2.3 Набор позволяет определять концентрацию АТ к ТПО в сыворотке крови человека в диапазоне от 25 до 500 Ед/мл.

2.4 Продолжительность анализа составляет 2 ч 15 мин.

2.5 Принцип работы набора. Набор позволяет определять АТ к ТПО, принадлежащие к иммуноглобулинам класса G. На первой стадии анализа АТ к ТПО, содержащиеся в калибровочных и исследуемых пробах, связываются с тироидной пероксидазой, иммобилизованной на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизованные АТ к ТПО взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству АТ к ТПО в исследуемом образце.

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

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.2 Стоп-реагент, представляющий собой 1Н раствор соляной кислоты, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

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

3.4 Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

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

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 агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток хранят при температуре (2-8)°С в течение 48 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20°С). Избегать повторных циклов замораживания-размораживания. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

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

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо использовать пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

4.2 При вскрытии и растворении лиофилизованных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

4.3 При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение новой калибровочной кривой и рекомендуется определение концентрации АТ к ТПО в контрольной сыворотке.

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Фотометр типа «Multiskan» для измерения оптической плотности или аналогичный ему;

- термостатируемый шейкер типа «iEMS Incubator/Shaker», позволяющий производить встряхивание со скоростью (500-800) об/мин при температуре 37 °С или аналогичный ему;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,005 до 5,0 мл (от 5 до 5000 мкл);
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 0,3 мл (до 300 мкл);
- мерные цилиндры вместимостью 500 и 1000 мл;

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

- пробирки одноразовые с пробками вместимостью 3 мл;
- штатив для пробирок;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70%;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25)° С в течение 30 мин.

Все образцы сывороток и реагенты перед проведением анализа тщательно перемешать.

6.2 Подготовка растворов калибровочных проб и контрольной сыворотки

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или пробкам. Открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды. Флаконы закрыть пробками, выдержать в течение 10 мин при температуре (18-25)°С и аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая образования пены. В течение следующих 10 мин выдержать флаконы при температуре (18-25)°С, периодически перемешивая их содержимое.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Растворенные калибровочные пробы и контрольную сыворотку, а также вскрытые флаконы с жидкими калибровочными пробами и контрольной сывороткой можно хранить при температуре (2-8)° С не более 1 месяца.

6.3 Приготовление буферного раствора для промывания лунок иммуносорбента

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести содержимое флаконов с буферным раствором Р, затем добавить дистиллированной воды до метки 560 мл и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с буферным раствором Р интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимое количество буферного раствора Р в мерный стакан или цилиндр и развести его дистиллированной водой в 20 раз.

Пример – В мерный цилиндр внести 5 мл буферного раствора Р и 95 мл дистиллированной воды, перемешать раствор, избегая образования пены.

Раствор можно хранить закрытым при температуре (2-8) °С не более 5 суток.

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

Неиспользованный буферный раствор Р можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.4 Подготовка иммуносорбента

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в фирменный пакет с этикеткой, который затем вложить в закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки. Стрипы можно хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

6.5 Подготовка буферного раствора Д, конъюгата Е и раствора ТМБ

Буферный раствор Д, конъюгат Е и раствор ТМБ готовы к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8)° С не более 1 месяца.

6.6 Подготовка буферного раствора А и стоп-реагента

Буферный раствор А и стоп-реагент готовы к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности.

6.7 Подготовка проб исследуемых образцов сывороток крови человека

Пробирки для разведения исследуемых образцов сывороток крови человека поместить в штатив и маркировать следующим образом: № 1, № 2 и т.д.

Перед проведением анализа все исследуемые образцы сывороток крови человека развести Буферным раствором Д в 100 раз.

Пример – Образец № 1 (разведение в 100 раз): в пробирку, маркированную «№ 1», внести 0,01 мл (10 мкл) исследуемого образца сыворотки крови и 0,99 мл (990 мкл) буферного раствора Д, перемешать раствор, избегая образования пены.

Внимание! При определении концентрации АТ к ТПО этот фактор разведения не учитывается, т.к. он учтен при построении калибровочной кривой.

Если значение концентрации АТ к ТПО в исследуемых образцах сывороток крови по предварительным данным превышает 500 Ед/мл, образцы следует дополнительно развести еще в 20 раз.

Пример – Образец № 1' (дополнительное разведение в 20 раз): в пробирку, маркированную «№ 1'», внести 0,01 мл (10 мкл) образца № 1 и 0,19 мл (190 мкл) буферного раствора Д, перемешать раствор, избегая образования пены.

Внимание! При определении концентрации АТ к ТПО результат необходимо умножить на коэффициент разведения (20).

Внимание! Разводить сыворотку крови следует только в день проведения анализа. При повторной постановке тех же образцов сывороток крови человека необходимо делать новое разведение.

7 Требования к промыванию планшета

7.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них;
- необходимо при каждом промывании все лунки заполнить раствором до краев (0,30-0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лу-

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

нок, встряхнуть планшет на шейкере в течение (5-10) с с последующим декантированием;

- при каждом декантировании тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамкой со стрипами в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена;
- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 Проведение анализа

8.1 Составить протокол маркировки лунок в соответствии с рисунком 1. Лунки маркировать следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Т	Т	№1									
B	C_0	C_0	№1									
C	C_1	C_1	№2									
D	C_2	C_2	№2									
E	C_3	C_3	№3									
F	C_4	C_4	№3									
G	C_5	C_5	№4									
H	КС	КС	№4									

Рисунок 1

- A1, A2 — «Т» для раствора ТМБ;
- B1, B2 — для калибровочной пробы C_0;
- C1, C2 — для калибровочной пробы C_1;
- D1, D2 — для калибровочной пробы C_2;
- E1, E2 — для калибровочной пробы C_3;
- F1, F2 — для калибровочной пробы C_4;
- G1, G2 — для калибровочной пробы C_5;
- H1, H2 — для контрольной сыворотки (КС);
- A3,B3 - …. —для образцов исследуемых сывороток крови человека №1 – ….

8.2 Внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 0,1 мл (100 мкл) буферного раствора А.

8.3 Внести **в дубликатах** в соответствующие лунки по 0,05 мл (50 мкл) калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки – по 0,05 мл (50 мкл) проб предварительно разведенных исследуемых образцов сывороток крови.

Внимание! Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и проб исследуемых образцов сыворотки крови не должны превышать 15 мин, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам!

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

8.4 Инкубировать планшет на термостатируемом шейкере при температуре **37° С в течение 1 ч.**

8.5 Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета буферным раствором для промывания лунок иммуносорбента (п 6.3) **пять раз**.

8.6 Внести немедленно во все лунки, кроме лунок А1 и А2, по 0,12 мл (120 мкл) конъюгата Е.

8.7 Инкубировать планшет на термостатируемом шейкере при температуре **37° С в течение 1 ч.**

8.8 Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета буферным раствором для промывания лунок иммуносорбента (п 6.3) **пять раз**.

8.9 Внести немедленно во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) раствора ТМБ и инкубировать планшет **в защищенном от света месте при температуре (18-25)° С в течение 15 мин.**

8.10 Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1мл (100 мкл) стоп-реагента. Планшет встряхнуть на шейкере в течение **(1-2) мин.**

8.11 Не позже чем через 1 мин после остановки реакции, определить ОП в лунках в одноволновом режиме при длине волны **450 нм** против воздуха.

В случае невозможности по техническим причинам своевременно измерить ОП растворов в лунках на фотометре, планшет можно хранить при температуре **(2-8)°** С **не более 20 мин**.

8.12 Схема анализа приведена в таблице 1.

9 Обработка результатов анализа

9.1 Если программа фотометра позволяет вычитать величину ОП в лунках А1 и А2 из значений ОП всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы образцов сывороток крови, ОЕ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину ОП лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $B–B_T$, где B_T — среднее арифметическое значение ОП лунок А1 и А2, ОЕ; В — среднее значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы образцов сывороток крови, ОЕ.

9.2 Рассчитать величину В, ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыворотку, пробы исследуемых образцов сывороток крови.

9.3 В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости величины В, ОЕ, от концентрации АТ к ТПО в калибровочных пробах, Ед/мл, откладывая на оси ординат значения ОП, ОЕ, а по оси абсцисс – значения концентраций АТ к ТПО, Ед/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

9.4 Определить по калибровочному графику концентрацию АТ к ТПО в пробах исследуемых образцов сывороток крови, Ед/мл.

В случае дополнительного разведения исследуемых образцов сывороток крови необходимо измеренную концентрацию АТ к ТПО умножить на фактор разведения.

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

Внимание! В случае дополнительного разведения исследуемых образцов сывороток крови следует иметь ввиду, что по причине гетерогенности АТ к ТПО для некоторых образцов линейный характер изменения концентрации при разведении может нарушаться!

Таблица 1 – Схема проведения анализа

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с протоколом маркировки лунок по п 8.1								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-48
Буферный раствор А, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
КП C_0, мкл	–	50	–	–	–	–	–	–	–
КП C_1, мкл	–	–	50	–	–	–	–	–	–
КП C_2, мкл	–	–	–	50	–	–	–	–	–
КП C_3, мкл	–	–	–	–	50	–	–	–	–
КП C_4, мкл	–	–	–	–	–	50	–	–	–
КП C_5, мкл	–	–	–	–	–	–	50	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	50	–
C_X, мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
Инкубация №1	37° С, термостатируемый шейкер, 1 ч								
5-кратная промывка: промывочный буферный раствор, мкл	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300
Конъюгат Е, мкл	–	120	120	120	120	120	120	120	120
Инкубация №2	37° С, термостатируемый шейкер, 1 ч								
5-кратная промывка: промывочный буферный раствор, мкл	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №3	(18-25)° С, 15 мин, защищенное от света место								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	(18-25)° С, шейкер, (1-2) мин								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Спектрофотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания
1 КП – калибровочная проба;
2 КС – контрольная сыворотка;
3 C_X – анализируемые пробы.

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

10 Аналитические характеристики набора

10.1 Специфичность. Использование высокоочищенного ТПО для сенсибилизации стрипов обеспечивает высокую специфичность анализа.

10.2 Коэффициент вариации результатов определения АТ к ТПО в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «ТироидИФА-атТПО» не превышает 8 %.

10.3 Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» АТ к ТПО – отношение измеренной к расчетной концентрации АТ к ТПО в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы C_2. Процент открытия составляет (90–110) %.

10.4 Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АТ к ТПО в сыворотке крови человека не превышает 4 Ед/мл.

10.5 Клиническая проверка. Содержание АТ к ТПО измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 324 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Измеренная концентрация АТ к ТПО не превышала 30 Ед/мл в 99,4 % случаев.

10.6 Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций АТ к ТПО, Ед/мл, соответствующие нормальным.

11 Форма выпуска набора

11.1 Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

1 **комплект 1** – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на **4 постановки** ИФА: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки). Всего – **96 определений**;

2 комплект 2 – для проведения анализа на автоматическом анализаторе открытого типа. Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на 6 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок). Всего – 96 определений.

12 Условия хранения и применения набора

12.1 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 5 суток.

Запрещается замораживать компоненты набора.

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

12.3 Срок годности набора – 12 месяцев.

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

Библиография

[1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь

[2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД

[3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы

[4] Постановление № 33 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 г.
О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников

[5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Главным специалистом
СП ООО «Фармлэнд» Ю.В.Сенчук

Ведущим-технологом Е.И.Лаврецкой

Ведущим специалистом по
диагностическим тест-системам И.М.Богдановской

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

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Здравоохранения
Республики Беларусь

_____ В.Е.Шевчук
"05" 11 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ К ТИРОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЕ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ТироидИФА-атТПО
Комплект 2

СП ООО "Фармлэнд",
Генеральный директор

_____ В.В.Голынников
"12" 11 2007 г.

2008

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

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для количественного определения концентрации аутоантител к тироидной пероксидазе в сыворотке крови человека "in vitro" методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 Аутоантитела (АТ) к тироидной пероксидазе (ТПО) относятся в основном к иммуноглобулинам класса G и реже — к иммуноглобулинам класса М. ТПО является ферментом, играющим ключевую роль в процессе синтеза тироидных гормонов. В сыворотке крови здоровых лиц АТ к ТПО могут содержаться в концентрации до 30 Ед/мл. Превышение этого порога свидетельствует об аутоиммунном процессе, как правило, приводящем к нарушению функции щитовидной железы в основном за счет снижения секреции тироксина. Определение АТ к ТПО в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики аутоиммунных тиреоидных заболеваний (идиопатическая микседема, тиреоидит Хашимото, диффузный токсический зоб).

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 комплект
Калибровочная проба C_0*	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба C_1*	2 флакона по 0,5 мл
Калибровочная проба C_2*	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба C_3*	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба C_4*	2 флакона по 0,5 мл
Калибровочная проба C_5*	1 флакон; 0,5 мл
Контрольная сыворотка	2 флакона по 0,5 мл
Конъюгат антител против IgG человека с пероксидазой (Конъюгат Е)	1 флакон; 17 мл
Аналитический буферный раствор (Буферный раствор А)	1 флакон; 14 мл
Буферный раствор для разведения образцов сыворотки крови (Буфер Д)	2 флакона по 50 мл
Концентрированный буферный раствор для промывания лунок (Буферный раствор Р)	1 флакон; 28 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ)	2 флакона по 14 мл
Стоп-реагент	1 флакон; 48 мл
Многоцелевые пробирки	100 штук
Концентрированный раствор Триала (Триал)	1 флакон; 50 мл
*Значения концентрации АТ к ТПО в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов.	

2.1 Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для из-

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

мерения значения оптической плотности (ОП) раствора ТМБ. Всего – 96 определений при использовании всех стрипов одновременно.

Набор рассчитан на 6 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок).

2.3 Набор позволяет определять концентрацию АТ к ТПО в сыворотке крови человека в диапазоне от 25 до 500 Ед/мл.

2.4 Продолжительность анализа составляет 2 ч 15 мин.

2.5 Принцип работы набора. Набор позволяет определять АТ к ТПО, принадлежащие к иммуноглобулинам класса G. На первой стадии анализа АТ к ТПО, содержащиеся в калибровочных и исследуемых пробах, связываются с тироидной пероксидазой, иммобилизованной на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизованные АТ к ТПО взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству АТ к ТПО в исследуемом образце.

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

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.2 Стоп-реагент, содержащий соляную кислоту, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

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

3.4 Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

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

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 агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток хранят при температуре (2-8)° С в течение 48 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20° С). Избегать повторных циклов замораживания-размораживания. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

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

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;

4.2 В случае дробного применения набора необходимо извлечь калибровочные пробы и контрольную сыворотку из автоматического анализатора после их внесения в лунки планшета, участвующие в постановке анализа и, плотно закрыв крышками, убрать в холодильник. Не допускается повторное использование калибровочных проб и контрольной сыворотки, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности. Остальные жидкие реагенты убрать в холодильник сразу по окончании сессии. Эти ограничения обусловлены естественным испарением жидкостей, приводящим к получению некорректных результатов измерения при последующем использовании реагентов.

4.3 При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение новой калибровочной кривой и рекомендуется определение концентрации АТ к ТПО в контрольной сыворотке.

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Автоматический иммуноферментный анализатор открытого типа «Alisei» или аналогичный ему;

- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,02 до 1,0 мл (от 20 до 1000 мкл);
- мерный цилиндр вместимостью 500 мл;
- пробирки одноразовые с пробками вместимостью 3 мл;
- штатив для пробирок;
- вата медицинская гигроскопическая;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70%;

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

- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25)° С в течение 30 мин.

6.2 Подготовка растворов калибровочных проб и контрольной сыворотки

Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Вскрытые флаконы с калибровочными пробами и контрольной сывороткой можно хранить при температуре (2-8)° С не более 1 месяца.

6.3 Приготовление буферного раствора для промывания лунок иммуносорбента

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести содержимое флаконов с буферным раствором Р, затем добавить дистиллированной воды до метки 560 мл и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

Раствор можно хранить закрытым при температуре (18-25)° С не более 5 суток.

6.4 Приготовление рабочего раствора Триала для промывания внутренних магистралей и игл автоматического анализатора

В стеклянную колбу вместимостью 6000 мл внести содержимое флакона с раствором Триала, затем добавить 4950 мл дистиллированной водой и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

Раствор можно хранить закрытым при температуре (18-25)° С не более 5 суток.

6.5 Подготовка иммуносорбента

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности.

6.6 Подготовка буферного раствора Д, конъюгата Е и раствора ТМБ

Буферный раствор Д, конъюгат Е и раствор ТМБ готовы к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8)° С не более 1 месяца.

6.6 Подготовка буферного раствора А и стоп-реагента

Буферный раствора А и стоп-реагент готовы к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности.

6.7 Подготовка проб исследуемых образцов сывороток крови человека

Перед проведением анализа все исследуемые образцы сывороток крови человека развести Буферным раствором Д в 100 раз. Разведение исследуемых образцов сывороток крови производится в соответствии с инструкцией к анализатору «Alisei».

Если значение концентрации АТ к ТПО в исследуемых образцах сывороток крови по предварительным данным превышает 500 Ед/мл, образцы следует допол-

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

нительно развести еще в 20 раз. Дополнительное разведение исследуемых образцов производится в соответствии с инструкцией к анализатору.

Внимание! В случае дополнительного разведения исследуемых образцов следует иметь в виду, что по причине гетерогенности АТ к ТПО для некоторых образцов линейный характер изменения концентрации при разведении может нарушаться.

Внимание! Разводить сыворотку крови следует только в день проведения анализа. При повторной постановке тех же образцов сывороток крови человека необходимо делать новое разведение.

7 Проведение анализа

7.1 Иммуноферментный анализатор «Alisei» имеет полностью автоматизированный процесс проведения анализа: внесение реагентов, промывка, инкубирование, измерение оптической плотности, обработка результатов. Программа определения концентрации АТ к ТПО введена в память анализатора.

8 Аналитические характеристики набора

8.1 Специфичность. Использование высокоочищенного ТПО для сенсибилизации стрипов обеспечивает высокую специфичность анализа.

8.2 Коэффициент вариации результатов определения АТ к ТПО в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «ТироидИФА-атТПО» не превышает 8%.

8.3 Линейность. Зависимость концентрации АТ к ТПО в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций (25–500) Ед/мл и составляет ± 10 %.

8.4 Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» АТ к ТПО – отношение измеренной к расчетной концентрации АТ к ТПО в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы C_2. Процент открытия составляет (90–110) %.

8.5 Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АТ к ТПО в сыворотке крови человека не превышает 4 Ед/мл.

8.6 Клиническая проверка. Содержание АТ к ТПО измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 324 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Измеренная концентрация АТ к ТПО не превышала 30 Ед/мл в 99,4 % случаев.

8.7 Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций АТ к ТПО, Ед/мл, соответствующие нормальным.

9 Форма выпуска набора

9.1 Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

1 комплект 1 – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на 4 постановки ИФА: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки). Всего – 96 определений;

2 **комплект 2** – для проведения анализа на автоматическом анализаторе открытого типа. Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвест-

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

ных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на **6 постановок** иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок). Всего – **96 определений**.

10 Условия хранения и применения набора

10.1 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 5 суток.

Запрещается замораживать компоненты набора.

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

10.3 Срок годности набора – 12 месяцев.

Библиография

[1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь

[2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД

[3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы

[4] Постановление № 33 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 г.
О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников

[5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Главным специалистом
СП ООО «Фармлэнд» Ю.В.Сенчук

Ведущим-технологом Е.И.Лаврецкой

Ведущим специалистом по
диагностическим тест-системам И.М.Богдановской

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