УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от_____2010 г.

№_____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Ю. С. Лебедин

«11» января 2010 г

ИНСТРУКЦИЯ

По применению Набора реагентов для иммуноферментного определения аутоантител к тиреопероксидазе в сыворотке(плазме)крови

«АТ-ТПО-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «АТ-ТПО-ИФА» предназначен для определения концентрации аутоантител к тиреопероксидазе (АТ-ТПО) в сыворотке(плазме)крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Тироидные микросомальные антитела –это циркулирующие иммуноглобулины против компонента гладкого эндоплазматического ретикулума клеток щитовидной железы.Основным компонентом этого микросомального антигена является фермент тиреопероксидаза(ТПО). Этиантитела преимущественно принадлежат классуIgG. При аутоиммунных заболеваниях щитовидно йжелезы желательно определять одновременно аутоантитела кТПОи аутоантитела к тиреоглобулину(АТ-ТГ).Антитела к ТГи/или АТ-ТПО определяются в высоких концентрациях при болезни Грейвса,тиреоидитеХашимото и его разновидностях:ювенильном лимфоцитарном тиреоидите,хроническом фиброзном варианте тиреоидита ,идеопатической мекседеме, атрофическом асимптоматическом тиреоидитеи, синдроме Шмита .Поскольку у пациентов в зависимости от этапа заболевания может наблюдаться гипо-,гипер-или эутиреоидная стадия,определение данных антител является более точным диагностическим признаком при постановке диагноза аутоиммунного поражения щитовидной железы и определения степени поражения, чем проведение классических гормональных тестов. Постановка данных тестов особенно важна при диагностике следующих состояний:клинических проявлениях болезни Грейвса без признаков экзофтальма и увеличения щитовидной железы,определение гипотиреоза у подростков.

Определение повышенных значений АТ-ТПО у женщин во время первых месяцев беременности является фактором риска тиреоидита в послеродовом периоде. Высокий уровень АТ-ТПО может определяться при лечении амиодароном.Это лекарство назначается при сердечной анемии и содержит 37,2% йода, который быстро выводится из организма. Известно, что это лекарство вызывает гипотиреоз у 20% пациентов в регионах с пониженным потреблением йода.Было найдено, что у пациентов с гипотериозом, вызванным применением этого лекарства,имеются, циркулирующие антитела к ТПО.

КОПИЯ ВЕРНА

Таким образом перед назначением лечения у данных пациентов на ряду с трийодтиронином (Т3), тироксином (Т4), тиреотропным гормоном (ТТГ) необходимо проводить этот тест.

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

1.2. Диагностическая значимость определения.

Определение АТ-ТПО в сыворотке (плазме) крови используется обычно для клинической лабораторной диагностики патологий щитовидной железы различной этиологии.

1.3. Область применения-клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1.Принцип работы Набора. Определение аутоантител к тиреопероксидазе основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизован антиген ТПО.Антитела из образца связываются с антигеномна поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком«сэндвич»,содержащий пероксидазу.

Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина(ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации АТ-ТПО в исследуемом образце.Концентрации АТ-ТПО в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания АТ-ТПО в калибровочных пробах.

2.2.Состав Набора:

- **планшет** 96-луночный, полистироловый, стрипированный, готов к использованию-1шт.;
- **-Калибровочные пробы** на основе фосфатного буфера,содержащие известные количества аутоантител к тиреопероксидазе-**О;30; 100;300и1000МЕ/мл;** концентрации АТ-ТПО в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин,,точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов(по1,1млкаждая);
- **конъюгат;**готов к использованию-1флакон(14мл);
- **ИФА-Буфер;**готов, к использованию-1флакон(50мл);
- **раствор субстрата тетраметилбензидина(ТМБ),** готов к использованию-1флакон(l4мл):
- **контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием АТ-ТПО, готова к использованию-1пробирка или флакон(1,1мл);
- **концентрат** отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой) 26х-кратный-1флакон(22мл);
- **стоп-реагент,** готов к использованию-1флакон(14мл);
- липкая лента с бумажной подложкой для заклеиваниия планшета, готова к использованию-2шт.;
- Инструкция по применению Набора реагентов «АТ-ТПО-ИФА»;
- Паспорт контроля качества Набора реагентов «АТ-ТПО-ИФА».

КОПИЯ ВЕРНА

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность.Использование высокоочищенного препарата тиреопероксидаза позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «АТ-ТПО-ИФА » концентрация аутоантител к тиреопероксидазе в сыворотке(плазме) крови не превышает 2,5МЕ/мл

3.3. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания АТ-ТПО в одном и том же образце сыворотки(плазмы)крови с использованием Набор ареагентов«АТ-ТПО-ИФА» не превышает8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» АТ-ТПО-соответствие измеренной концентрации АТ-ТПО предписанной ,полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочнойпробы100МЕ/мл

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность.

Зависимость концентрации АТ-ТПО в образцах сыворотки (плазмы)крови при разведении их сывороткой(плазмой) крови,не содержащей АТ-ТПО ,имеет линейный характер в диапазоне концентраций 30-1000МЕ/мл и составляет=10,0%.

3.6. Клиническая проверка.Нормальные значения.

Исследуемаягруппа	Единицы	
	МЕ/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины	-	30
Женщины	-	30
Женщиныстарше50лет	-	50

В соответствии с требованиямиGLP(GoodLaboratoryPractice,ХорошаяЛабораторнаяПрактика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «АТ-ТПО-ИФА» уточнить значения концентрации аутоантител к тиреопероксидазе, соответствующие нормальному обследуемого контингента.

4. МЕРЫПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора-класс 2а(ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности-соблюдение «*Правил устройства ,техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах ,)санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР*» (Москва,1981г.).

КОПИЯ ВЕРНА

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- **Фотометр вертикального сканирования** ,позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450нм;

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

- **дозаторы** со сменными наконечниками,позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 25-250мкл;
- **цилиндр мерный** вместимостью 1000мл;
- **вода дистиллированная;**
- **перчатки** резиновые или пластиковые;
- **бумага** фильтровальная.

6.АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1 .Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре(+18-25°С) не менее 30мин.

6.2.Образцы сыворотки(плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 °С не более 24 ч или при температуре минус 20 °С не более 2недель.

6.3.Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные,мутные образцы сыворотки (плазмы)крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4.При использовании Набора реагентов «АТ-ТПО-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого рекомендуется определение АТ-ТПО в контрольной сыворотке.

6.5.Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. .Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы,чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре+2-8°Св течение всего срока годности Набора.

6.6.Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл,добавить 440мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26раз(1мл концентрата+25мл дистиллированной воды)..

5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Разбавьте образцы сыворотки(плазмы)крови в101раз, используя ИФА-Буфер.

7.2. Если предполагаемая концентрация АТ-ТПО в исследуемом образце превышает 1000М Е/мл ,его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер .

КОПИЯ ВЕРНА

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

Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может искажать результаты определения.

7.3.Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по100мкл исследуемых образцов сыворотки(плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение5-1Омин.

7.4. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности,заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30мин при температуре +37°с.

7.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например,с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 3 раза путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием .При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.6.Внести во все лунки по100мкл конъюгата.

7.7.3аклеить планшет бумагой для заклеивания планшета иинкубировать его в течение 30минут при температуре+37°с.

7.8.По окончании инкубации удалить содержимое лунок и отмыть лунки 5раз.

7.9. Внести во все лунки планшета по 100мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)..Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина(ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2мин.

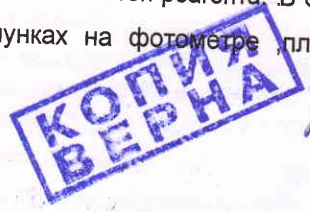
Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25°С) в течение 10-20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.10. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности ,как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) ,по100мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение1-2мин..

8.РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине олны 450нм. .Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести не позднее 15 мин после внесения стоп-реагента. .В случае невозможности своевременного измерения ОП растворов в лунках на фотометре ,планшет допускается хранить при температуре+2-8°С не более 4ч.



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

9.УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1.Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс-концентрация аутоантител к тиреопероксидазе в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат –оптическая плотность калибровочных проб ($ОП_{450}$) .Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика использовать интервальный (кусочно-линейный,«от точки к точке») метод.

9.2.Определить по калибровочному графику содержание АТ-ТПО в исследуемых образцах. Если используемый образец предразводили ,умножить полученный результат на фактор разведения.

9.3 .Набор«АТ-ТПО-ИФА» может быть использован для скрининга.

Для этого необходимо внести в 2 лунки планшета по 100 мкл калибровочной пробы О МЕ/мл, в 2 другие лунки -по 100 мкл калибровочной пробы 30 МЕ/мл,в остальные лунки –по 100мкл разведенных исследуемых образцов сыворотки(плазмы) крови.

Сравнить значение ОП каждого исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови с ОП калибровочной пробы 30МЕ//мл(ОПК).Если значение ОП исследуемого образца выше ,чем величина ОПК(+10%) ,то этот результат следует считать положительным (более 30МЕ/ 1лАТ-ТПО).Если значение ОП исследуемого образца ниже, чем ОПК (-10%), то этот результат следует считать отрицательным. Если значение ОП исследуемого образца находится в пределах±10,0%, то этот результат следует считать сомнительным.

1О.УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ИЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «АТ-ТПО-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре+2-8° С в течение всего срока годности (18мес.). Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуредо+25°снеболее 15сут.

10.2 .Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных образцов, 5калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки-всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре+2-8 °С в течение всего срока годности Набора;

- конъюгат, ИФА-Буфер, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона следует хранить при температуре+2-8°С в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов). следует хранить при температуре+2-8°С не более 2мес.;при необходимости более длительного хранения-при температуре минус20°С в течение всего срока годности Набора;

- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре(+18-25°С) не более 15сут.или при температуре+2-8°снеболее45сут.;

- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре+2-8°свтечение всего срока годности Набора.

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

КОПИЯ ВЕРНА

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

По вопросам ,касающимся качества Набора реагентов «АТ-ТПО-ИФА», следует обращаться ООО «ХЕМА» по адресу:105264, г.Москва, ул.9-я Парковая,д.48, к.4,тел/факс *(495).7370040.*

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА» _____ к. б. н. Д. С. Кострикин
11 января 2010 г.

М.П.

«СОГЛАСОВАНО»
Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздрава _____ д.м.н., профессор В. В. Долгов

М.П.

Подпись В.В. Долгов
удостоверяю: специалист по кадровой работе ГОУ ДПО РМАПО Росздрава
подпись

КОПИЯ ВЕРНА

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