



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп.3
Факс (37517) 263-62-57

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

ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ № ИМ-7.93148/1209 от 28.09.2012 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

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

1.2 Результаты измерения содержания анти-ТПО могут быть использованы для диагностики аутоиммунных тиреоидных заболеваний – тиреоидита Хашимото, идиопатической микседемы, диффузного токсического зоба. Анти-ТПО обнаруживается также у больных раком щитовидной железы, и их определение может быть использовано для прогнозирования течения злокачественного процесса.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [¹²⁵I]-белок А, жидкий препарат, готовый к использованию, 1 флакон, 33 мл, общая активность (90-300) кБк;
- биотинилированная тиреопероксидаза (далее - биотин-ТПО), жидкий препарат, готовый к использованию, 2 флакона по 16,5 мл;
- пробирки полистирольные с иммобилизованным авидином, готовые к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы анти-ТПО в диапазоне концентраций (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 WHO NIBSC 66/387);
- буферный раствор для разведения, жидкий препарат, готовый к использованию, 1 флакон, 100 мл;
- концентрат промывочного раствора* (КПР), жидкий препарат, 1 флакон, 50 мл;
- контрольная сыворотка (КС), лиофилизованный препарат, 1 флакон.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных проб, 1 пробы общей активности [¹²⁵I]-белка А, 6 калибровочных проб и 1 пробы КС, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 3 часа.

Диапазон определяемых концентраций анти-ТПО в образцах сыворотки крови человека (10-1800) МЕ/мл.

2.4 Принцип метода состоит в следующем. Анти-ТПО, присутствующие в сыворотке крови человека, связываются с биотин-ТПО, образовавшийся комплекс биотин-ТПО/анти-ТПО связывается с иммобилизованным на пробирках авидином или стрептавидином. Пробирки промывают и инкубируют с меченым [¹²⁵I] белком А, который связывается с анти-ТПО. Несвязавшийся [¹²⁵I]-белок А удаляют с помощью водоструйного насоса. Концентрацию анти-ТПО в исследуемых пробах сыворотки крови человека определяют по калибровочной кривой зависимости активности связанного [¹²⁵I]-белка А от концентрации анти-ТПО в калибровочных пробах.

* **ВНИМАНИЕ!** Концентрат промывочного раствора в наборе ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ идентичен промывочному раствору, входящему в состав наборов ИРМА-АНТИ-ТГ-СТ и ИРМА-ТГ-СТ и при необходимости может использоваться для промывки проб в этих наборах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее - РВ) (Нормы радиационной безопасности ГН 2.6.1.8-127 и Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности СанПиН 2.6.1.8-8).

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.

3.3 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные передавать ВИЧ, вирус гепатита или другие вирусные инфекции.

3.4 Работы проводить 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].

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

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

4.1 Гамма-счетчик колодезного типа;

- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- вихревой смеситель;
- водоструйный насос;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,025; 0,3; 1,0 и 2,0 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;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки хирургические резиновые.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

5.1 Компоненты набора перед использованием необходимо выдерживать при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Внести в колбу 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.

5.3 Во флакон, содержащий КС, внести 0,25 мл дистиллированной воды. Через 10 мин. осторожно перемешать содержимое флакона, избегая образования пены.

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

5.4 Разведение КС и исследуемых проб сыворотки крови человека.

5.4.1 Подготовить серию пластмассовых пробирок (не из набора) для разведения КС и исследуемых проб сыворотки крови человека.

5.4.2 Внести в соответствующие пробирки (на дно пробирок) по 0,025 мл (25 мкл) КС и исследуемых проб сыворотки крови человека.

5.4.3 Внести во все пробирки по 1,0 мл (1000 мкл) буферного раствора для разведения и перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя. Разбавленные КС и исследуемые пробы сыворотки крови человека могут храниться при температуре (2-8) °С не более 3 суток.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованным авидином маркируют следующим образом (в дубликатах): Т – для определения общей активности [¹²⁵I]-белка А; В₀-В₅ – для калибровочных проб анти-ТПО; В_{КС} – для КС; В_Х – для исследуемых проб сыворотки крови человека.

6.2 В пробирки В₀-В₅ внести по 0,025 мл (25 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирку В_{КС} внести по 0,025 мл (25 мкл) предварительно разведенной по п.5.4 КС. В пробирки В_Х внести по 0,025 мл (25 мкл) предварительно разведенных по п.5.4 исследуемых сывороток крови человека.

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

6.4 Инкубировать все пробирки при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок в течение 1 ч при температуре (18-25) °С.

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

6.6 Во все пробирки, кроме Т, внести по 2 мл промывочного раствора (п.5.2). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса.

Повторить стадию промывки.

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

6.8 Инкубировать все пробирки при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок в течение 1 ч и температуре (18-25) °С.

6.9 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок, кроме Т, жидкость с помощью водоструйного насоса.

6.10 Во все пробирки, кроме Т, внести по 2 мл промывочного раствора (п.5.2). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок, кроме Т, с помощью водоструйного насоса.

После промывки в пробирках не должно оставаться следов красителя.

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

6.12 Последовательность внесения реагентов в пробирки и проведение других операций анализа приведены в таблице 1. Данную последовательность не нарушать!

Таблица 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций					
	Калибровочные пробы, разведенные контрольная и исследуемые пробы, мл	Биотин-ТПО, мл	Инкубировать при постоянном встряхивании в течение 1 ч. 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.
Т	-	-			-	Повторить
В ₀ -В ₅	0,025	0,3			2,0	стадио
В _{КС}	0,025	0,3			2,0	промывки
В _Х	0,025	0,3			2,0	

Продолжение таблицы 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций				
	¹²⁵ I-белок А, мл	Пробирки инкубировать при постоянном встряхивании в течение 1 ч при температуре (18-25)°С	Тщательно удалить из всех пробирок, кроме Т, жидкость с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить промывочный раствор с помощью водоструйного насоса.
Т	0,3			-	
В ₀ -В ₅	0,3			2,0	
В _{КС}	0,3			2,0	
В _Х	0,3			2,0	

Измерить скорость счета [¹²⁵I] в каждой пробирке в течение 1 мин.

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [¹²⁵I] для каждой пары пробирок. Из полученных значений скоростей счета вычесть среднее арифметическое значение скорости счета в пробирках В₀.

7.2 Рассчитать величину (В₅-В₀)/Т, (В₁-В₀) / (В₅-В₀) в процентах для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки крови человека, где В₁ – среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I] в пробирках В₁-В₅, В_{КС} и В_Х.

7.3 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения (В₁-В₀) / (В₅-В₀), в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций анти-ТПО, в МЕ/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

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

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

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

8.1.1 Использование высокоочищенной ТПО для биотинилирования обеспечивает высокую специфичность анализа.

8.2 Чувствительность

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

8.3 Воспроизводимость результатов

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

8.4 Тест на "открытие"

8.4.1 Соответствие значений измеренной и известной концентраций анти-ТПО в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы С₄ составляет (85-115)%.

8.5 Клиническая проверка набора

8.5.1 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.

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

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Компоненты набора должны храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

9.2 Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, сыворотку с повышенным содержанием липидов.

Образцы сыворотки крови хранить при температуре (2-8) °С, если анализ проводят в течение 48 ч после взятия крови. Образцы сыворотки

крови можно хранить при температуре не менее минус 15-20 °С в течение более длительного времени (допускается только однократное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при температуре (18-25) °С.

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

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

9.5 Если концентрация анти-ТПО в исследуемом образце выходит за пределы калибровочного графика, образец следует развести буферным раствором для разведения, 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.

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

10 ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

10.1 Результаты определения должны быть интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данные других тестов и подходящую иную информацию.

10.2 При выполнении анализа с использованием антител возможна интерференция гетерофильными антителами в пробе пациента. У пациентов, имеющих постоянный контакт с животными или проходивших иммунотерапию, диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или их фрагментов могут вырабатываться антитела, которые способны повлиять на результаты иммунного анализа. Влияние этих антител может привести к получению ошибочных результатов.

Для получения надежных результатов необходимо тщательно проверять результаты анализа на наличие этих антител у пациентов с подозрением.

Приложение А
(Информационное)
Библиография

- [1] Приказ №351 от 16.12.98г. Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [2] СП 17-69 РБ 98
Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний
- [3] Приказ № 165 МЗ РБ от 25.11.2002 г.
О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения