



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5, корп.3
Факс (017) 263-62-57

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

ИФА-АНТИ-ТГ

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
28.06.2011 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИФА-АНТИ-ТГ предназначен для определения концентрации антител к тиреоглобулину в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа.

1.2 Количественное определение уровня антител к тиреоглобулину в крови необходимо для диагностики нарушений в системе гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- иммуносорбент, 1 шт.;
- конъюгат, 1 микропробирка или флакон, 0,6 мл;
- калибровочные пробы (C₀-C₅), в диапазоне концентраций анти-ТГ (0, 50-6000) МЕ/мл (точные значения концентраций анти-ТГ указываются на этикетках), 6 микропробирок или флаконов по 0,2 мл;
- контрольная сыворотка (КС) – лиофилизированный препарат, 1 микропробирка или флакон, или жидкий препарат, 1 микропробирка или флакон, 0,2 мл;
- буферный раствор для разведения сывороток (PPC), 1 флакон, 60 мл;
- концентрат буферного раствора для промывания планшета (КРП), 1 флакон, 22 мл;
- буферный раствор для разведения конъюгата (РПК), 1 флакон, 13 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР), 1 флакон, 13 мл;
- раствор ТМБ, 1 флакон, 0,7 мл;
- стоп-реагент, 1 флакон, 13 мл.

2.2 Набор ИФА-АНТИ-ТГ рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, 1 контрольной и 6 калибровочных проб – всего 96 определений.

2.3 Принцип работы набора состоит в следующем.

При внесении в лунки иммуносорбента образцов исследуемых сывороток антитела, специфические к тиреоглобулину, связываются с тиреоглобулином на твердой фазе, образуя иммунные комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы выявляют при помощи конъюгата – белок А–пероксидаза хрена. После отмывания не связанных компонентов в лунки планшета добавляют раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и раствор-ТМБ. Во время инкубации с хромоген-субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках.

Пероксидазную реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм.

Величина ОП пропорциональна концентрации анти-ТГ в калибровочных пробах и в образце сыворотки крови. Чем выше содержание антител в образце сыворотки, тем выше интенсивность окрашивания.

На основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация антител к тиреоглобулину в определяемых образцах.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

3.2. Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1] и [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

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

3.4 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ. НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- 4.1 Спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета или стрипа при 450 нм;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- суховоздушный термостат типа TC-80 M2 или аналогичный ему;
- вихревой смеситель типа «Vortex»;
- пипетки многоканальные полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 до 1,0 мл;
- кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки;
- цилиндры мерные вместимостью 25 мл, 100, 1000 мл;
- стаканы химические мерные вместимостью 200 мл, 1000 мл;
- флакон из стекла или пластмассы вместимостью 15 мл с закрывающейся крышкой;
- пробирки полистирольные с пробками;
- штатив для пробирок;
- бумага фильтровальная;
- перчатки одноразовые, резиновые или пластиковые.
- вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

5.2 Подготовка стрипов

Перед началом работы освободить необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Стрипы, которые не используются в данной постановке, можно хранить в плотно закрытом пакете без доступа влаги при температуре (2-8) °С в течение трех месяцев.

5.3 Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

В случае лиофилизованной контрольной сыворотки в микропробирку внести 0,2 мл дистиллированной воды, перемешать, избегая образования пены.

После вскрытия микропробирок растворы можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

Перед работой микропробирку с калибровочными пробами и КС интенсивно встряхнуть, избегая образования пены.

5.4 Приготовление раствора конъюгата

В чистый флакон отобрать определенный объем РПК, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), и необходимый объем конъюгата, тщательно перемешать.

Таблица 1

Количество используемых стрипов	Объем конъюгата, мкл	Объем РПК, мл
4	170	4,0
8	340	8,0
12	540	12

5.5 Приготовление раствора для промывания планшета

Содержимое флакона концентрата раствора для промывания планшета интенсивно встряхнуть, отобрать в мерный стакан необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов (таблица 2), добавить дистиллированной воды до нужного объема и перемешать раствор.

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

5.6 Приготовление хромоген-субстратного раствора.

В чистый флакон отобрать определенный объем СБР, заданный количеством используемых стрипов (таблица 2), и необходимый объем раствора ТМБ, тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! Хромоген-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием! Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным.

Таблица 2

Количество используемых стрипов	Раствор для промывания планшета		Хромоген-субстратный раствор	
	КРП, мл	Дистиллированная вода, мл	Раствор ТМБ, мл	СБР, мл
4	5	225	0,2	4
8	10	450	0,4	8
12	20	900	0,6	12

Примечание: Приготовление хромоген-субстратного раствора требуется только в том случае, если раствор ТМБ и СБР поставляется в виде отдельных компонентов.

5.7 Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия флакона раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

5.8 Подготовить одноразовые пластиковые пробирки в количестве, соответствующему количеству анализируемых образцов сыворотки крови. Маркировать пробирки Vx1-xi и установить их в штативе. В каждую пробирку внести по 1,0 мл буферного раствора для разведения сывороток (PPC) и 0,01 мл (10 мкл) соответствующей анализируемой пробы, используя для каждой пробы индивидуальный наконечник к пипетке. Перемешать содержимое пробирок, используя вихревой смеситель. Избегать избыточного вспенивания при перемешивании. Разведенные образцы сыворотки крови человека могут храниться при температуре (2-8) °С в течение 3 суток.

5.9 Если предполагается высокая концентрация анти-ТГ в исследуемом образце сыворотки крови (выше 6000 МЕ/мл), образцы следует предварительно развести PPC в 10 раз. После проведения анализа результат необходимо умножить на коэффициент разведения (10).

5.10 Требования к промыванию планшетов

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; лунки должны заполняться до краев (0,3 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- необходимо выдерживать лунки, заполненными раствором для отмывания планшетов не менее 30 с;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Составить протокол маркировки лунок. Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом: N1 - B₀, N2 - B₁, N3 - B₂, N4 - B₃, N5 - B₄, N6 - B₅, N7 - B_{КС}, N_х - неизвестные образцы.

6.2 Отобрать из каждой микропробирки с калибровочными пробами, КС и неизвестными образцами по 0,03 мл раствора и внести в соответствующие лунки.

6.3 Во все промаркированные лунки, внести по 0,07 мл раствора для разведения сывороток. Перемешать содержимое лунок используя встряхиватель или 5-6 круговыми движениями по поверхности стола.

6.4 Планшет закрыть крышкой и инкубировать 1 час в термостате при температуре 37 °С.

6.5 Удалить содержимое лунок. Все лунки промыть 3 раза промывочным раствором (по 0,3 мл в лунку). Удалить остатки жидкости.

6.6 Во все лунки внести по 0,1 мл раствора конъюгата, приготовленного по п.5.4

6.7 Планшет закрыть крышкой и инкубировать 1 час в термостате при температуре 37 °С.

6.8 Удалить содержимое лунок. Все лунки промыть 3 раза промывочным раствором (по 0,3 мл в лунку). Удалить остатки жидкости.

6.9 Во все лунки внести по 0,1 мл хромоген-субстратного раствора, приготовленного по п. 5.6 Инкубировать при комнатной температуре в темноте в течение 15-25 мин. в зависимости от степени развития окраски.

6.10. Остановить реакцию добавлением во все лунки по 0,1 мл стоп-реагента, встряхнуть планшет или стрип. Измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 450 нм не позже чем через 15 мин после остановки реакции.

7 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

7.1 Рассчитать средние арифметические значения ОП, в ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы – B₀ – B₅, контрольную сыворотку – B_{КС}, исследуемые образцы сыворотки крови – V_х.

Значение B₀ не должно превышать 0,2 ОЕ;

Значение B₅ не должно превышать 3,2 ОЕ.

7.2 Построить калибровочную кривую в линейных или полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат значения ОП, в ОЕ, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентрации анти-ТГ, в МЕ/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

7.3 Определить по калибровочному графику содержание анти-ТГ в КС. Содержание анти-ТГ в КС должно соответствовать указанному на этикетке значению.

7.4 По калибровочному графику определить содержание анти-ТГ, МЕ/мл, в исследуемых образцах сыворотки крови человека.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

В наборе ИФА-АНТИ-ТГ при изготовлении иммуносорбента используют высокоочищенный тиреоглобулин, что обеспечивает высокую специфичность анализа.

8.2 Чувствительность

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

8.3 Воспроизводимость результатов

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

8.4 Тест на "открытие"

Процент "открытия" анти-ТГ, добавленных в образцы сыворотки крови с известной концентрацией анти-ТГ, составляет (80-120) %.

8.5 Клиническая проверка набора

Концентрация анти-ТГ в сыворотке крови здоровых лиц обоего пола (n=100), определенная с помощью набора ИФА-АНТИ-ТГ, составила (0-50) МЕ/мл в 98 % случаев, концентрации анти-ТГ выше 100 МЕ/мл не было выявлено.

8.6 Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентрации анти-ТГ соответствующие нормальным.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Набор реагентов должен храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 3 суток.

Замораживание набора запрещается.

9.2 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащих агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток можно хранить при температуре (2-8)°С не более 48 ч после взятия пробы. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20°С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать от отдельным наконечником.

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

9.3 Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдать инструкции по применению набора и квалифицированное проведение 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.

9.4 Набор рассчитан на 3 постановки иммуноферментного анализа: 1 постановка – 4 стрипа (32 лунки). Для каждой постановки необходимо построение новой калибровочной кривой и рекомендуется определение концентрации анти-ТГ в КС.

9.5 Срок годности набора –12 месяцев с даты изготовления.