



Унитарное предприятие
«Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. Академика Курчатова В.Ф., 5, корп.3
Факс (017) 263-62-57

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛА К ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЕ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
«ИФА-анти-ТПО»**

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1. Набор реагентов «ИФА-анти-ТПО» предназначен для количественного определения антител к тиреопероксидазе (анти-ТПО) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа. Набор предназначен только для применения *in vitro*.

1.2. Тиреопероксидаза (ТПО) – гликопротеин щитовидной железы, который является ферментом синтеза тиреоидных гормонов и главным тиреоидным аутоантигеном. Анти-ТПО являются поликлональными и представлены главным образом иммуноглобулинами класса G (субклассы G1, G2 и G4), и в меньшей степени – иммуноглобулинами классов A и M. Они присутствуют в крови у 5% здоровых мужчин и у 10% здоровых женщин в возрасте до 50 лет. Анти-ТПО являются диагностическим маркером хронического лимфоцитарного тиреоидита (тиреодит Хашимото) и содержатся в высокой концентрации в сыворотке крови (90-100) % больных с этим диагнозом. Кроме того, определение анти-ТПО в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики послеродового (скрытого) аутоиммунного тиреоидита, подострого тиреоидита и диффузного токсического зоба.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1. Состав набора:

№	Название компонента	Количество
1	Иммуносорбент (96-луночный полистирольный стриповый планшет с иммобилизованной ТПО)	1 шт.
2	КРП (Концентрат раствора для промывания планшета)	1 фл. 50 мл
3	СБР (Субстратный буферный раствор)	1 фл., 13 мл
4	Концентрат конъюгата	1 фл., 0,6 мл
5	Раствор для разведения анализируемых проб	1 фл., 45 мл
6	Калибровочные пробы (0-3200 МЕ/мл)	5 мкрп. по 0,8 мл
7	Контрольная сыворотка	1 мкрп., 0,8 мл
8	Раствор для разведения концентрата конъюгата	1 фл., 13 мл
9	Стоп-раствор	1 фл., 13 мл
10	Раствор ТМБ	1 фл., 0,7 мл

Примечание: 1. Конъюгат может поставляться в готовом к использованию виде (конъюгат, 1 флакон, 13 мл). В этом случае в состав набора не входит р-р для разведения концентрата конъюгата.

2. Субстратный буферный р-р и раствор ТМБ могут поставляться в одном флаконе (хромоген-субстратный р-р, 1 флакон, 13 мл).

3. Р-р для разведения анализируемых проб может быть расфасован в 2 флакона по (23±0,5) мл

4. Концентрат промывочного раствора может быть расфасован в 2 флакона по (26±0,5) мл.

2.2. Набор ИФА-Анти-ТПО рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных проб, одной контрольной и 5 калибровочных проб при использовании в всех стрипов одновременно.

Примечание: При необходимости набор может быть разделен на 2-3 независимые части с различным количеством определяемых проб.

Принцип работы набора состоит в следующем.

На первой стадии анализа происходит образование иммунного комплекса между иммобилизованной на пластике ТПО и находящимся в растворе анти-ТПО. Количество анти-ТПО на твердой фазе прямо пропорционально их содержанию в составе калибровочных проб и анализируемых образцов сыворотки крови. На второй стадии происходит образование иммунного комплекса между анти-ТПО, находящимся на твердой фазе в составе комплекса с антигеном, и белком А (*Staphylococcus aureus*), находящимся в растворе в виде конъюгата с пероксидазой из корней хрена.

Во время инкубации с хромоген-субстратной смесью происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству анти-ТПО на твердой фазе. После остановки ферментативной реакции и измерения оптической плотности раствора в лунках определяют концентрацию анти-ТПО в анализируемых образцах сыворотки крови на основании калибровочного графика.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови и человека могут длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

3.2. Все компоненты набора, за исключением раствора ТМБ (тетраметилбензидин) являются нетоксичными.

3.3. При работе с набором следует соблюдать правила работы с токсичными веществами.

3.4. 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. Набор реагентов "ИФА-АНТИ-ТПО";
- спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета или стрипа при 450 нм;
- магнитная мешалка типа ММ-5;
- суховоздушный термостат, поддерживающий температуру (37±1)°С;
- вихревой смеситель типа «Vortex»;
- секундомер;
- 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;
- кювета для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки;
- цилиндры мерные в вместимостью 25 мл (3 шт), 100 мл;
- стакан химический мерный в вместимостью 200 мл;
- стакан химический мерный в вместимостью 1000 мл;
- флакон из пластмассы черного цвета вместимостью 15 мл с завинчивающейся крышкой;
- флакон из стекла или пластмассы вместимостью 15 мл с завинчивающейся крышкой;
- пробирки полистирольные с пробками;
- шпатель для пробирок;
- бумага фильтровальная;
- перчатки одноразовые, резиновые или пластиковые.
- вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

5.1. Перед использованием выдержать компоненты набора и анализируемые образцы сыворотки крови при температурой (18-25) ° в течение 30 минут.

5.2. Вскрыть упаковку и установить в рамки планшета необходимое число стрипов, в зависимости от количества определяемых образцов сыворотки крови. Выдержать стрипы при комнатной температуре не менее 30 мин. Остальные стрипы можно хранить при температуре (2-8)°С в закрытом полиэтиленовом пакете.

5.3. В случае использования предварительно замороженных образцов сыворотки крови убедиться в полноте их размораживания. Перемешать содержимое пробирок с образцами сыворотки крови, используя вихревой смеситель. Избегать избыточного вспенивания при перемешивании.

5.4. Подготовить одноразовые пластиковые пробирки в количестве, соответствующем количеству анализируемых образцов сыворотки крови. Маркировать пробирки Vx1-xi и установить их в шпатель. В каждую пробирку внести по 1 мл раствора для разведения анализируемых проб. В каждую пробирку внести по 0,01 мл (10 мкл) соответствующей анализируемой пробы, подготовленной по п.5.3, используя для каждой пробы индвидуальный наконечник пипетки. 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.

5.5 Промывочный раствор

Промывка в автоматическом режиме

При использовании в всех стрипов одновременно в стакан химический мерный емкостью 1000 мл внести 950 мл дистиллированной воды. Добавить 50 мл содержимого флаконов с концентратом промывочного раствора. Тщательно перемешать, избегая пенообразования. При использовании части стрипов следует готовить промывочный раствор в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Значение			
	4	6	8	12
Количество стрипов, шт	4	6	8	12
Концентрат промывочного р-ра (20- кратный) мл	15	25	35	50
Дистиллированная вода, мл	285	475	665	950

Промывка в ручном режиме

При использовании в всех стрипов одновременно в стакан химический мерный емкостью 200 мл внести 190 мл дистиллированной воды. Добавить 10 мл содержимого флаконов с концентратом промывочного раствора. Тщательно перемешать, избегая пенообразования. При использовании части стрипов следует готовить промывочный раствор в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Наименование показателя	Значение			
	4	6	8	12
Количество стрипов, шт	4	6	8	12
Концентрат промывочного р-ра (20-кратный), мл	4	5	7	10
Дистиллированная вода, мл	76	95	133	190

Промывочный раствор можно хранить при температуре (2 - 8)°С в течение 3 суток. Не следует использовать промывочный раствор из других наборов.

5.6. Конъюгат. При использовании в всех стрипов одновременно во флакон вместимостью 15 мл внести 12 мл раствора для разведения концентрата конъюгата и добавить 480 мкл концентрата конъюгата. Закрыть флакон и

тщательно перемешать, избегая пенообразования. При использовании части стрипов следует готовить раствор конъюгата в соответствии с таблицей 3

Наименование показателя	Значение			
	4	6	8	12
Количество стрипов, шт	4	6	8	12
Концентрат конъюгата (26-кратный), мкл	160	240	320	480
Раствор для разведения концентрата конъюгата, мл	4	6	8	12

5.7 Хромоген-субстратная смесь готовится непосредственно перед употреблением (см. п.6.8)

5.8 После приготовления компонентов набора в количестве, необходимом для проведения анализа, поместить оставшиеся неиспользованными компоненты набора в холодильник.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Записать схему расположения на планшете пар лунок, предназначенных для калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых проб в соответствии с таблицей 4

Таблица 4

A	B ₀	B ₄	№3	№7
B				
C	B ₁	KC	№4	№8
D				
E	B ₂	№1	№5	№9
F				
G	B ₃	№2	№6	№10
H				

Рисунок 2 – Примерная схема расположения на планшете калибровочных проб (B₀-B₄), контрольной сыворотки (KC) и анализируемых проб (№№1-10)

6.2 Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 0,1 мл раствора калибровочных проб и контрольной сыворотки.

6.3 Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 0,1 мл раствора анализируемых проб сыворотки крови, приготовленных по п. 5.4. Не допускается перерыв между внесением в лунки калибровочных проб, контрольной пробы и анализируемых проб сыворотки крови. Заполнять лунки планшета ритмично в течение максимально короткого времени.

6.4 Закрывать планшет крышкой или липкой лентой и инкубировать в термостате при температуре 37°С в течение 60 мин.

6.5 После окончания инкубации открыть планшет, перевернуть вверх дном и стряхнуть над раковиной для удаления содержимого лунок. Во все лунки внести по 0,2 мл промывочного буфера, приготовленного по п 5.5. Удалить содержимое лунок переворачиванием планшета. Повторить стадию промывки еще 2 раза. После окончания промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге. Не допускается многократное использование фильтровальной бумаги. Избегать длительного пребывания промывочного раствора в лунках планшета нахождения планшета сухим после промывки.

В случае промывки планшета с использованием промывочного оборудования, ранее использованного для промывки планшетов из набора, где в качестве фермента применяется не пероксидаза из корней хрена, а другой фермент, оборудование предварительно тщательно промыть дистиллированной водой.

6.6 В каждую лунку внести по 0,1 мл раствора конъюгата, приготовленного по пункту 5.6. Заполнять лунки планшета раствором конъюгата ритмично в течение максимального короткого времени.

6.7 Закрывать планшет крышкой или липкой лентой и инкубировать в термостате при температуре 37°С в течение 45 мин.

6.8 Приготовление хромоген-субстратной смеси

За 10 мин до окончания инкубации во флакон из пластмассы черного цвета внести необходимое количество субстратного раствора и раствора ТБМ в соответствии с таблицей 5. Тщательно перемешать. Поставить в темное место до использования.

Таблица 5

Наименование показателя	Значение			
Количество стрипов, шт	4	6	8	12
Субстратный раствор, мл	4	6	8	12
Раствор ТБМ, мл	0,2	0,3	0,4	0,6

Хромоген-субстратная смесь не должна контактировать с окислителями и ионами металлов. При приготовлении хромоген-субстратной смеси избегать воздействия прямых солнечных лучей. Полученный раствор не подлежит хранению.

6.9 По окончании инкубации удалить содержимое лунок переворачиванием планшета. Промыть лунки в соответствии с п. 6.5.

6.10 Убедиться в отсутствии голубой окраски хромоген-субстратной смеси, приготовленной по п. 6.8. Убедиться в отсутствии капель, царапин, отпечатков пальцев и других загрязнений на дне лунок. В случае обнаружения загрязнений аккуратно удалить их мягкой салфеткой. Внести во все лунки внести по 0,1 мл хромоген-субстратной смеси. Инкубировать стрипы в течение 15 - 20 мин при температуре (18 – 25) °С в темноте.

6.11 Добавить во все лунки по 0,1 мл стоп-раствора для остановки ферментной реакции. Добавлять стоп-раствор во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как хромоген-субстратную смесь. Перемешать содержимое лунок 5-6 круговыми движениями планшета по поверхности стола.

6.12 Измерить на спектрофотометре оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 15 мин.

7. РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Рассчитать средние арифметическое значение оптической плотности для каждой пары параллельных измерений.

7.2 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая по оси ординат (линейная зависимость) значения оптической плотности В_i в ОЕ, а по оси абсцисс (логарифмическая зависимость) – значения концентраций анти-ТПО, в МЕ/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

7.3 Проверить соответствие полученных значений содержания анти-ТПО в контрольной пробе и концентрации, указанной на этикетке. Если полученное значение находится в указанных пределах, анализ проведен правильно.

7.4 По калибровочному графику определить содержание анти-ТПО в анализируемых пробах сыворотки крови.

8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Характеристика ТПО. Для иммобилизации в лунках планшета используются высокоочищенная полноразмерная природная ТПО человека.

8.2 Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая концентрация анти-ТПО – 9 МЕ/мл

8.3 Специфичность. Использование высокоочищенной ТПО обеспечивает высокую специфичность анализа. На результаты анализа не оказывают влияние сывороточные антитела к тиреоглобулину.

8.4 Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определений (n=10) анти-ТПО в одном и том же образце сыворотки крови не превышает 10%.

8.5 Тест на «открытие». Соответствие значений измеренной и известной концентраций анти-ТПО в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной пробы и калибровочной пробы В₂ составляет (85-115)%.

8.6 Клиническая проверка. При использовании набора ИФА-анти-ТПО концентрация анти-ТПО в сыворотке крови здоровых доноров (n=100) не превышает 60 МЕ/мл. В таблице 6 приведены ориентировочные данные, полученные при измерении концентрации анти-ТПО в образцах сыворотки крови человека с использованием набора ИФА-анти-ТПО.

Таблица 6

Состояние	Содержание анти-ТПО, МЕ/мл
Здоровый донор	до 60
Сомнительный диагноз	61-100
Легкая патология	101-500
Тяжелая патология	свыше 500

Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора ИФА-анти-ТПО уточнить значения концентрации анти-ТПО, соответствующие норме для обследуемого контингента и региона.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Набор реагентов ИФА-анти-ТПО должен храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора. Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 1 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

9.2 Планшеты после вскрытия упаковки могут храниться в плотно закрытом пакете при температуре (2 - 8) °С не более 30 суток.

9.3 Компоненты набора после вскрытия флаконов могут храниться при температуре (2 - 8) °С не более 30 суток.

9.4 Приготовленная хромоген-субстратная смесь не подлежит хранению.

9.5 Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре (2 - 8) °С не более 3 суток.

9.6 Пробы сыворотки крови, используемые для анализа, можно хранить при температуре (2 - 8) °С не более 24 ч с момента их получения, при температуре не менее минус 20°С – не более 3 месяцев. Допускается только однократное замораживание и размораживание проб сыворотки крови. Не допускается замораживание подготовленных к анализу, разбавленных в 101 раз проб сыворотки крови.

9.7 Ограничения

9.7.1 Не следует держать планшет и растворы на ярком свете во время хранения и проведения анализа

9.7.2 Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизную, мутную сыворотку крови, сыворотку с микробиологическим проростом, а также сыворотку содержащую азид натрия. При наличии в образцах сыворотки крови сгустков фибрина, осадка или взвешенных частиц удалить примеси центрифугированием. Кроме того, не следует использовать сыворотку крови, подвергавшуюся более чем однократному замораживанию и размораживанию или хранившуюся в негерметично закрытых пробирках.

9.7.3 Для каждого независимого анализа проб сывороток крови необходимо построение нового калибровочного графика. Кроме того, рекомендуется определение анти-ТПО в контрольной пробе.

9.7.4 Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдать инструкции, квалифицированное проведение анализа и использование стандартизированного лабораторного оборудования – дозирующих устройств, термостата, спектрофотометра и промывающего устройства для планшетов.