

атТПО-Имаксиз (IMAXYZ)

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ 2011 г.

№ _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор

ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

Е.Н. Схолль-Энгбертс

«15» _____ 2011 г.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АУТОАНТИТЕЛ К ТИРОИДНОЙ ПЕРОКСИДАЗЕ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(атТПО-Имаксиз (IMAXYZ))**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «атТПО-Имаксиз (IMAXYZ)» предназначен для количественного *in vitro* определения концентрации аутоантител к тиреоидной пероксидазе (ТПО) в сыворотке крови человека.

1.2. ТПО представляет собой слабо гликозилированный гем-содержащий белок, играющий важную роль в процессе йодирования тиреоглобулина и синтезе тиреоидных гормонов. Прежде чем поступивший в щитовидную железу йодид будет использован для синтеза тиреоидных гормонов, он должен быть окислен до активной формы при помощи ТПО и перекиси водорода. Активированный таким образом йодид способен йодировать молекулу тирозина с образованием монойодтирозина (МИТ) или дийодтирозина (ДИТ), из которых в дальнейшем образуются тиреоидные гормоны.

1.3. ТПО часто является мишенью аутоантител при аутоиммунной тиреоидной болезни. Аутоантитела к ТПО (атТПО) относятся, в основном, к классу G и определяются в крови у более чем 90% пациентов с тиреоидитом Хашимото и у более чем 70% пациентов, страдающих болезнью Грейвса, независимо от функционального статуса щитовидной железы. Имеется четкая связь между наличием

атТПО-Имаксиз (IMAXYZ)

антител к ТПО и гистологической картиной тиреоидита. Однако, в связи со значительной способностью щитовидной железы к регенерации под действием тиреотропного гормона, клинические признаки гипотиреоза могут проявиться спустя годы после возникновения хронического заболевания ЩЖ. Отдельно следует выделить послеродовой тиреоидит, который может сопровождаться временным гипер- или гипотиреозом. Данное состояние развивается у 5% женщин в течение первого года после родов.

1.4. Набор «атТПО-Имаксиз (IMAXYZ)» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора тетраметилбензидина (ТМБ) при использовании всех стрипов одновременно.

В случае дробного применения необходима обязательная постановка всех калибровочных проб для каждого отдельного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

На первой стадии анализа атТПО, содержащиеся в калибровочных и исследуемых образцах, связываются с тиреоидной пероксидазой, иммобилизованной на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизованные атТПО взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими атТПО. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации атТПО в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольных материалах.

После остановки реакции стоп-реагентом (цвет раствора меняется с синего на желтый) и измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках проводится расчет концентрации атТПО в исследуемых образцах и контрольных материалах по калибровочному графику. Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

3. СОСТАВ НАБОРА МИКРОПЛАНШЕТ

1 упаковка

Разборный полистирольный микропланшет со стрипами, разделяемыми на отдельные лунки, с иммобилизованным ТПО, маркирован «Микропланшет с иммобилизованной ТПО».

КОНЬЮГАТ

1 флакон, 14 мл

Конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат».

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП)

комплект

Аттестованы по стандарту NIBSC 66/387, содержат известные количества антител к ТПО.

КП№1 - 1 флакон, 0,5 мл, содержит 0 МЕ/мл атТПО, маркирован «Калибровочная проба №1».

КП№2 - 1 флакон, 0,5 мл, содержит 25 МЕ/мл атТПО, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3 - 1 флакон, 0,5 мл, содержит 75 МЕ/мл атТПО, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4 - 1 флакон, 0,5 мл, содержит 150 МЕ/мл атТПО, маркирован «Калибровочная проба №4».

КП№5 - 1 флакон, 0,5 мл, содержит 250 МЕ/мл атТПО, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6 - 1 флакон, 0,5 мл, содержит 500 МЕ/мл атТПО, маркирован «Калибровочная проба №6».

ПРИМЕЧАНИЕ: точные номиналы калибровочных проб указаны на этикетках флаконов и в паспорте к набору реагентов.

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС)

1 флакон, 0,5 мл

Содержит известное количество атТПО, диапазон концентраций указан на этикетке флакона.

РАСТВОР ТМБ

1 флакон, 14 мл

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ

1 флакон, 14 мл

1М соляная кислота (HCL), маркирован «Стоп-реагент».

ПРОМЫВОЧНЫЙ БУФЕР.

2 флакона, 20 мл

Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (20-кратный концентрат), маркирован «Буфер П».

БУФЕР ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ

1 флакон, 50 мл

образцов сыворотки крови,

атТПО-Имаксиз (IMAXYZ)

Водно-солевой раствор, маркирован «Буфер Р». Готов к использованию.

БУФЕР А

1 флакон, 14 мл

Водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А». Готов к использованию.

Дополнительно в состав набора могут входить:

- защитная пленка для микропланшетов;
- пластиковые ванночки для реактивов;
- одноразовые наконечники;
- полиэтиленовый пакет с замком для хранения микропланшета.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация атТПО в сыворотке крови человека не превышает 2 МЕ/мл.

4.2. Специфичность. Использование ТПО с высокой степенью очистки для иммобилизации микропланшетов обеспечивает проведение высокоспецифичного анализа, обуславливающее достаточную диагностическую эффективность исследования для использования в алгоритме дифференциальной диагностики заболеваний щитовидной железы.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации атТПО в образцах сыворотки крови при разведении их буфером для разведения образцов, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90 - 110%.

4.4. Точность. Соответствие измеренной концентрации атТПО в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3, составляет 90–110%.

4.5. Коэффициент вариации результатов определения атТПО в одном и том же образце с использованием набора «атТПО-Имаксиз (IMAXYZ)» не превышает 8%.

4.6. Клиническая проверка. Концентрация атТПО была измерена в сыворотках крови 200 здоровых людей в возрасте 21-45 лет. Полученные значения концентрации атТПО не превысили 35 МЕ/мл в 98% случаев. При использовании набора рекомендуется уточнить

значения концентраций атТПО, соответствующие нормальным, с учетом особенностей популяции (ГОСТ Р ИСО 15189).

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Реагенты, входящие в состав набора, предназначены исключительно для лабораторной *in vitro* диагностики.

5.2. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

5.3. В учреждениях, в которых осуществляется работа с наборами реагентов, следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

5.4. Несмотря на то, что производные крови человека, входящие в состав наборов, были проверены на наличие антител к ВИЧ 1 и 2 типа, вирусу гепатита С, а также HBsAg и дали отрицательный результат, необходимо с калибраторами, контрольными материалами обращаться как с образцами, несущими инфекционную опасность, так как ни один существующий метод тестирования не может на 100% гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.5. При работе с исследуемыми образцами пациентов следует соблюдать меры предосторожности как в отношении инфекционно опасного материала. Настоятельно рекомендуется использование одноразовых перчаток и других рекомендованных мер защиты (спецодежду), позволяющих снизить риск инфицирования.

5.6. Все материалы, контактировавшие с образцами крови пациентов, контрольными и калибровочными материалами должны быть инаktivированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при 121°C, замачиванием в 5% растворе хлорамина Б в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом). Жидкие отходы, включая промывочные воды, должны быть инаktivированы добавлением сухого хлорамина Б из расчета 50 г/л в течение 2 часов, либо обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом.

5.7. Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор соляной кислоты и обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.8. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами реагентов.

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

- Одно- или многоканальные дозаторы с изменяемым объемом отбора жидкостей в диапазонах 10 – 100 мкл, 50 – 300 мкл для постановки анализа и в диапазонах 100 – 1000 мкл, 1000 – 5000 мкл, 1000 – 10000 мкл для приготовления реагентов.

- Одноразовые сменные наконечники для дозаторов.
- Пробирки для разведения образцов сыворотки крови.
- Ванночки для реактивов для многоканального дозатора.
- Спектрофотометр, позволяющий производить измерение оптической плотности раствора в лунках при 450 нм.

- Термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание при температуре +37°C со скоростью 400 - 650 об/мин.

- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.

- Фильтровальная бумага.
- Цилиндр мерный на 200 мл.
- Стакан стеклянный вместимостью 500 мл.
- Вода деионизованная или дистиллированная.
- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Взятие крови для анализа следует проводить с использованием стандартных процедур для венозной крови, а образцы сыворотки должны быть освобождены от клеток крови центрифугированием. После центрифугирования сыворотка крови должна быть перенесена в отдельную пробирку.

7.2. Следует избегать использования в анализе плазмы крови, гемолизированной, мутной или гиперлипемичной сыворотки.

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азид натрия.

7.4. Образцы сыворотки крови следует использовать в течение 24-48 часов с момента получения при условии их хранения при +2...8°C. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре ниже -20°C. Избегать повторного замораживания образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1 Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

8.2 Предварительное разведение исследуемых образцов.

Перед проведением анализа все исследуемые образцы (за исключением калибровочных проб и контрольной сыворотки) должны быть разведены Буфером Р в 100 раз:

990 мкл Буфера Р + 10 мкл исследуемого образца.

Если значения атТПО в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения концентрации калибровочной пробы № 6, образцы следует **дополнительно** развести Буфером Р в 20 раз:

- 190 мкл Буфера Р + 10 мкл предварительно разведенного в 100 раз исследуемого образца. Тщательно перемешать.

Разведение сывороток крови пациентов следует проводить только непосредственно перед проведением анализа. Хранение разведенных образцов не допускается

8.3 Микропланшет. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение не менее 30 минут во избежание конденсации влаги на поверхности лунок. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов или лунок. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

8.4 Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию

8.5 Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера П развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

10 мл Буфера П + 190 мл деионизованной или дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

Готовый к использованию Промывочный буфер хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным 20-кратный «Буфер П» хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

8.6 Конъюгат готов к использованию.

8.7 Раствор ТМБ готов к использованию.

8.8 Стоп-реагент готов к использованию.

8.9 Буфер Р готов к использованию.

8.10 Буфер А готов к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТМБ	ТМБ	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	КП1	КП1	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	КП2	КП2	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	КП3	КП3	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	КП4	КП4	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	КП5	КП5	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	КП6	КП6	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	КС	КС	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

9.2. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл «Буфера А».

9.3. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл предварительно разведенной исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут.

9.4. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 1 часа в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 400 – 650 об/мин.

9.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в специальную емкость для сбора инфицированного материала и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 8.5, с последующим удалением жидкости в емкость для инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге до исчезновения следов наличия жидкости в лунках стрипов.

9.6. Во все лунки, кроме A1 и A2 внести по 120 мкл Конъюгата.

9.7. Инкубировать стрипы согласно п. 9.4.

9.8. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть лунки согласно п. 9.5.

9.9. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

9.10. Остановить ферментную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента. Цвет реакционной смеси в лунках должен измениться с синего на желтый. Встряхнуть на шейкере в течение 1–2 мин для равномерного перемешивания. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 минут. Схема проведения анализа приведена в **Таблице 1**.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

10.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность (ОП) раствора в лунках при длине волны 450 нм.

10.2. Определить среднее значение ОП в лунках A1 и A2 (контроль ТМБ) и вычесть его из среднего значения ОП калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

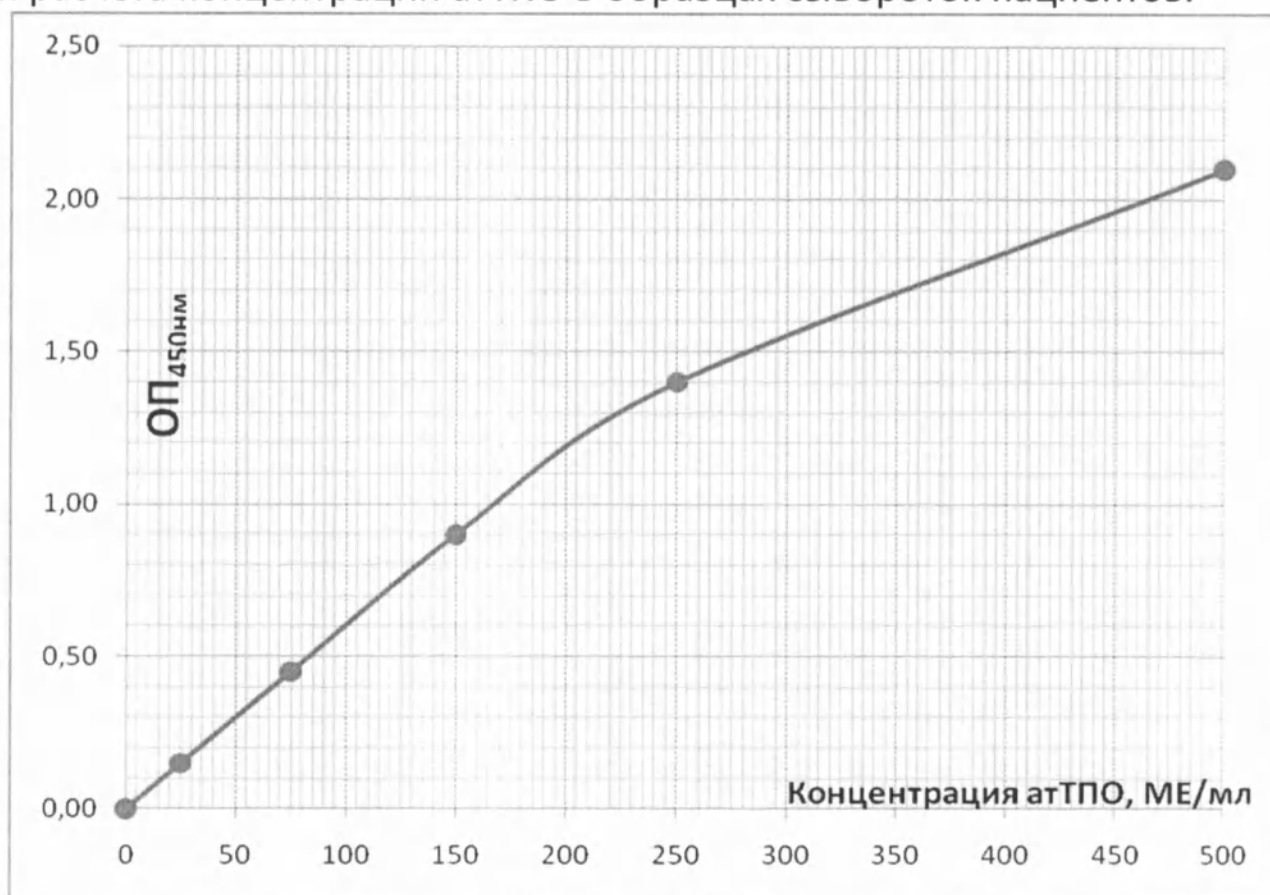
11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках A1 и A2 (контроль ТМБ) не превышает 0,1 ед.ОП.

атТПО-Имаксиз (IMAXYZ)

11.2. В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости ОП (ед.опт.плотн.) от концентрации атТПО в калибровочных пробах (МЕ/мл), используя средние значения ОП дубликатов.

11.3. Определить содержание атТПО в пробах по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов. В случае предварительного дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию атТПО умножить на фактор разведения.

Ниже приведен типичный график зависимости ОП калибровочных проб от концентрации в них атТПО. Данный график приведен исключительно в целях иллюстрации и не может быть использован для расчета концентрации атТПО в образцах сывороток пациентов:



12. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА.

12.1. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что количество независимых экспериментов ограничено объемом калибровочных проб.

12.2. Для каждого независимого эксперимента настоятельно рекомендуется построение нового калибровочного графика и определение концентрации аналита в контрольной сыворотке.

12.3. Не допускается использование реагентов разных серий при проведении анализа, а также использование ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера других фирм-производителей.

12.4. После окончания внесения реагентов необходимо плотно закрыть крышки флаконов и поместить их на хранение при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$.

12.5. Для диагностических целей результаты теста на антитела к ТПО должны использоваться в сочетании с другими лабораторными данными, общим клиническим представлением врача и другой соответствующей информацией. В низких концентрациях аутоантитела могут встречаться у 10% здорового населения и у пациентов с заболеваниями, не связанными со щитовидной железой, например, при воспалительных ревматических заболеваниях и сахарном диабете 1 типа.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

13.1. Набор должен храниться и транспортироваться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо после вскрытия хранить следующим образом:

- Микропланшет со стрипами хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- Конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$;
- Калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$;
- «Буфер Р» после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$;

- «Буфер П» и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

- Промывочный буфер, готовый к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C). Не добавлять в емкость с используемым промывочным буфером вновь приготовленный раствор;

13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции. Любые отклонения от рекомендованных процедур проведения анализа и приготовления реагентов могут привести к получению неверных результатов исследования.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**Таблица 1.**

	КП 1	КП 2	КП 3	КП 4	КП 5	КП 6	КС	Образцы
Буфер А	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
КП 1	50 мкл							
КП 2		50 мкл						
КП 3			50 мкл					
КП 4				50 мкл				
КП 5					50 мкл			
КП 6						50 мкл		
КС							50 мкл	
Образцы								50 мкл
Инкубация 1 час, +37°C, термостатируемый шейкер, 400-650 об/мин								
Промывка (5 раз) по 300 мкл в каждую лунку								
Конъюгат	120 мкл	120 мкл	120 мкл	120 мкл	120 мкл	120 мкл	120 мкл	120 мкл
Инкубация 1 час, +37°C, термостатируемый шейкер, 400-650 об/мин								
Промывка (5 раз) по 300 мкл в каждую лунку								
ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубация в темноте в течение 15-30 минут, КТ								
Стоп-реагент	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Регистрация результатов, фотометр, 450 нм								
<i>в течение 20 минут после добавления стоп-реагента</i>								

Примечание к таблице:

КП — калибровочная проба;

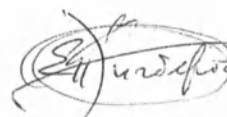
КС — контрольная сыворотка;

КТ — комнатная температура (+18...25°C).

ИФА-атТПО-ВИТАЛ

По вопросам качества набора обращаться в ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194156, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Энгельса, д. 27, корп. 38, лит. К, пом. 18,19, тел./факс (812)293-23-24 или в НОЦ «Институт лабораторной медицины» ГБОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздравсоцразвития по адресу: 197087, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д.6/8, тел. (812) 233-97-26.

Генеральный директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»



Е.Н. Схолль-Энгбертс.

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики с курсом молекулярной медицины,
директор НОЦ «Институт лабораторной медицины»
ГБОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздравсоцразвития,
Главный специалист-эксперт
по клин. лаб. диагностике Росздравнадзора
по С-ЗФО, д.м.н., профессор

В.Л. Эмануэль.

