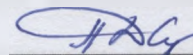


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«27» 2014 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации антител к тиреопероксидазе в сыворотке крови

(Анти-ТПО-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Анти-ТПО-ИФА-БЕСТ предназначен для определения концентрации антител к тиреопероксидазе в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Антитела к тиреопероксидазе (Анти-ТПО) – это циркулирующие гетерогенные иммуноглобулины, преимущественно класса G, против фермента, являющегося основным патогенным компонентом микросом. Они участвуют в реализации сложного механизма иммунного поражения щитовидной железы и, следовательно, являются основными факторами тиреоидных аутоиммунных заболеваний.

1.3. Количественное определение содержания Анти-ТПО в сыворотке крови имеет важное значение для диагностики аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (аутоиммунный тиреоидит, диффузный токсический зоб), а также при проведении контроля за эффективностью лечения.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 41 калибровочных образцов и 1 контрольного образца (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. В лунках планшета при добавлении исследуемого образца во время первой инкубации происходит

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией НИИ СД Н.Н. Сорокиной.

вание антител к тиреопероксидазе с тиреопероксидазой, иммобилизованной на внешней поверхности лунок. Во время второй инкубации при добавлении конъюгата происходит связывание антител к IgG, конъюгированных пероксидазой, с антителами к пероксидазе, иммобилизованными в ходе первой реакции. После удаления избытка конъюгата, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина, происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации тиреопероксидазы в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика определяется концентрация Анти-ТПО в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованной пероксидазой человека, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества Анти-ТПО – 0; 25; 100; 250; 500 и 1000 Ед/мл; аттестованные относительно Reference Material Anti-thyroid Microsome Serum, Human NIBSC 66/387; концентрации Анти-ТПО в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные значения указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 1,3 мл);
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека, с известным содержанием Анти-ТПО, аттестованный относительно Reference Material Anti-thyroid Microsome Serum, Human NIBSC 66/387, готовый для использования – 1 флакон (1,3 мл);
- конъюгат антител к IgG с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (1,3 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток – 1 флакон (10,0 мл);
- раствор для разведения сывороток – 1 флакон (12,0 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- плёнкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 5 – 200 мкл – 16 шт.;
- планшетом для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Использование высокоочищенной тиреопероксидазы для иммобилизации на планшете обеспечивает высокую специфичность анализа.

3.2.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определений Анти-ТПО в лунках, содержащих контрольный образец, не превышает 8%.

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – отклонение от расчётной величины концентрации Анти-ТПО при разведении калибровочных образцов, содержащих 1000; 500, 500 и 250 Ед/мл в 2 раза; 100 Ед/мл в 4 раза. Коэффициент линейности составляет 90-110 %.

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации Анти-ТПО предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 100 Ед/мл Анти-ТПО. Процент «открытия» составляет 90-110 %.

3.5.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация Анти-ТПО, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 2 Ед/мл.

3.6 Клиническая проверка. Концентрация Анти-ТПО, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 115 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 18 лет не превышала 30 Ед/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации Анти-ТПО, соответствующие нормальному у обследуемого контингента людей.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (приказ МЗ РФ от 06.06.12 № 141н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-

лактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и в
мических указаниях МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции,
рилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые
ки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально
онные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита
обудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором,
быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в
нениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и
тельными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не
ющие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород
например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов.
ование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 ,
р. хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в
ствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к
анию с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по
акции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского
ния».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения
кой плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в
шовом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в
ше 620 нм - 650 нм;

шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхи-
и температуре 37 ± 1 °C и 400-800 об/мин;

промывочное устройство для планшетов;

подильник бытовой;

шкетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным
со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до

- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости от 5 до 350 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.
2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 дней, при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.
3. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.
4. Образцы сывороток крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки должны выдерживать при температуре от 18 до 25 °C в течение времени не менее 30 мин.
2. Подготовка планшета.
 - 2.1. Открыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.
 - 2.2. Подготовка исследуемых образцов.
 - 2.2.1. Образцы должны быть готовы за 5-10 мин до начала анализа!
 - 2.2.2. Не использовать в течение 3 ч после разведения.
 - 2.2.3. Исследуемые образцы крови развести в 10 раз раствором для предварительного разведения и внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 10 мкл раствора для предварительного разведения сывороток и добавить по 10 мкл цельного эритроцитарного раствора для предварительного разведения сыворотки и добавить по 10 мкл цельного эритроцитарного раствора для предварительного разведения сыворотки крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки красный цвет изменится на желтый.

4. Приготовление промывочного раствора.

Вести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого раствора с твином (ФСБ-Т×25) и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых

при выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 30 сут.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

5. Приготовление калибровочных и контрольного образцов.

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений. Перед использованием встряхнуть.

После первого вскрытия калибровочные и контрольный образцы можно хранить в закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат утилизировать (не сливать во флакон с конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать (не сливать во ванночку с исходным раствором ТМБ плюс).

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс после первого вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых

7.8. Стоп-реагент готов к использованию. После первого вскрытия стоп-реагент можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.9. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочного стандарта и по 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дубликатах по 90 мкл для разведения сывороток и по 10 мкл анализируемых образцов сыворотки крови в оптимальном разведении (см. п. 7.3), тщательно перемешать.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин после вскрытия в использовании всех лунок планшета.

7.10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на магнитной мешалке при температуре 37 ± 1 °С и 650 об/мин.

7.11. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см. п. 7.4). Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок лунок должно быть не менее 4.

7.12. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.6).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые пипетки, входящие в состав набора.

7.13. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 1 °C и 650 об/мин.

7.14. По окончании второй инкубации содержимое лунок удалить и промыть лунки так, как указано в п. 7.11.

7.15. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.7) и инкубировать в темном от света месте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 1 °C и 650 об/мин.

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые пипетки, входящие в состав набора.

7.16. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и ТМБ плюс, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 мин при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по методу сравнения.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации Анти-ТПО калибровочных образцов (Ед/мл).

9.3. Определить содержание Анти-ТПО в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Вычислить среднее арифметическое значение концентрации для каждой пары лунок, содержащих анализируемые образцы. В случае многократного разведения анализируемых образцов необходимо полученную концентрацию Анти-ТПО умножить на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов Анти-ТПО-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке производителя при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности.

Допускается транспортирование набора при температуре до +25 °C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, контрольный образец, конъюгат после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности;

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для окончательного разведения сывороток, раствор для разведения сывороток, раствор ТМБ и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности;

- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток;

- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого нового эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации Анти-ТПО в реальном образце.

10.3. Если концентрация Анти-ТПО в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 1000 Ед/мл, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить тест и полученный результат умножить на 20.

10.4. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор ТМБ плюс), которые взаимозаменяемы в наборах ЗАО «Вектор-Бест».

10.5. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям действующей и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и эксплуатационные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют технической документации, если указанные недостатки явились следствием дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «Анти-ТПО-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, ЗАО «Вектор-Бест», тел. тел. (383) 363-20-60, тел./факс (383) 363-35-55.

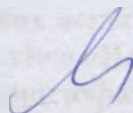
E-mail: vhobtk@vector-best.ru

Лаборатории НИИ СД
«Вектор-Бест»



Н.Н. Сорокина

Лаборатории НИИ СД
«Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
десять листов

[Handwritten signature]