

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

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь

В.Е.Шевчук
"12" 07 2007 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ предназначен для 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 <250 кБк;
- биотинилированная тиреопероксидаза (далее - биотин-ТПО), жидкий препарат, готовый к использованию, 2 флакона по 16,5 мл или лиофилизированный препарат, 2 флакона;
- пробирки полистирольные с иммобилизованным авидином (либо пробирки полистирольные с иммобилизованным стрептавидином), готовые к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы анти-ТПО в диапазоне концентраций (0-1800) 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*, жидкий препарат, 1 флакон, 50 мл;
- контрольная сыворотка (КС), лиофилизированный 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 контрольной сыворотки, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 3 ч.

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 сут.

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 постоянное 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,
НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

- 4.1 Гамма-счетчик колодезного типа;
- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- вихревой смеситель типа ВП;
- водоструйный насос типа КМ-1230;
- 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 схожести результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- пробирки пластмассовые вместимостью 3-5 мл с пробками;
- штатив для пробирок;
- стакан химический или колба плоскодонная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки хирургические резиновые.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

5.2 Внести в колбу плоскодонную вместимостью 1000 мл с помощью мерного стакана 950 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке.

Разбавленный промывочный раствор может храниться при (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

5.3 В каждый флакон, содержащий биотин-ТПО (если он лиофилизирован), внести по 16,5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать, избегая образования пены.

Разведенный биотин-ТПО может храниться при (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

5.4 Во флакон, содержащий КС, внести 0,25 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

5.5 Разведение КС и исследуемых проб сыворотки крови человека.

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

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

5.5.3 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 (2-8) °С в течение не более 2 сут.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованным авидином или стрептавидином 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 пробирки В_{КС} внести по 0,025 мл (25 мкл) предварительно разведенной по п.5.5 КС. В пробирки В_х

внести по 0,025 мл (25 мкл) предварительно разведенных по п.5.5 исследуемых сывороток крови человека.

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

6.4 Содержимое пробирок инкубировать в течение 1 ч при постоянном "мягком" встряхивании (приблизительно 300 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок при комнатной температуре (18-25) °С.

6.5 После окончания инкубации аккуратно удалить из всех пробирок, кроме Т, 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, кроме Т, с помощью водоструйного насоса.

Повторить стадию промывки.

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

6.8 Пробирки инкубировать в течение 1 ч при комнатной температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании на приборе для встряхивания пробирок.

6.9 После окончания инкубации аккуратно 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 дубл-ках)	Последовательность операций					
	Калибровочные пробы, разведенные КС и исследуемые пробы, мл	Биотин-ТПО, мл	Содержимое пробирок инкубировать 1 ч при температуре (18-25)°С при постоянном встряхивании	Аккуратно удалить из всех пробирок, кроме Т, жидкость с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки
Т	-	-			-	
В ₀ -В ₅	0,025	0,3			2	
В _{КС}	0,025	0,3			2	
В _Х	0,025	0,3			2	

Продолжение таблицы 1

Пробирки (в дубл-ках)	Последовательность операций			
	[¹²⁵ I]-белок А, мл	Пробирки инкубировать 1 ч при температуре (18-25)°С при постоянном встряхивании	После инкубации аккуратно удалить из всех пробирок, кроме Т, жидкость с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор, мл
Т	0,3			-
В ₀ -В ₅	0,3			2
В _{КС}	0,3			2
В _Х	0,3			2

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

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

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

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

Определить по калибровочной кривой концентрацию анти-ТПО, в МЕ/мл, в КС и исследуемых сыворотках крови человека.

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

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

8.1.1 Использование высокоочищенной ТПО для биотинилирования обеспечивает высокую специфичность анализа.

8.2 Чувствительность анализа

8.2.1 Минимальная концентрация анти-ТПО, определяемая с помощью набора, составляет 20 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 Процент "открытия" анти-ТПО, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией анти-ТПО, составляет 85-115%.

8.5 Клиническая проверка набора

8.5.1 При использовании набора ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ в 98% сывороток концентрация анти-ТПО не превышает 50 МЕ/мл. Значения концентраций выше 150 МЕ/мл считаются патологическими, большие с результатами в диапазоне (100-150) МЕ/мл нуждаются в динамическом наблюдении.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций анти-ТПО, соответствующие нормальным.

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 При вскрытии и растворении лиофилизированных компонентов набора необходимо следить, чтобы на пробках не осталось сухого вещества.

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

Образцы сыворотки крови хранят 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 20 °С в течение более длительного времени – не более 3 месяцев (допускается только однократное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

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

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

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

Приложение А (Информационное) Библиография

- [1] Приказ №351 от 16.12.98г. Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [2] Приказ № 66 от 20.04.93 г. О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы