

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ТПО (ТИРЕОЇДНА ПЕРОКСИДАЗА) ELISA

ТПО Ab ELISA

Каталог. №: EIA-4114

Дата випуску інструкції: 2015/06

Версія 3.0



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення Тиреоїдної Пероксидази (ТПО) антитіл у людській сироватці або плазмі мікропланшетним ферментним імуноаналізом. Вимірювання аутоантитіл ТПО може допомогти в діагностиці захворювань щитоподібної залози, таких як хвороба Хашимото і хвороба Грейвса, а також нетоксичний зоб.

2. РЕЗЮМЕ ТА ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ

Показано, що антитіла до тиреоїдної пероксидази характерні для пацієнтів з тиреоїдитом Хашимото (95%), ідіопатичною мідемою (90%) та хворобою Грейвса (80%)¹. Фактично 72% пацієнтів з позитивним анти-ТПО виявляють певний рівень дисфункції щитовидної залози. Це призвело до того, що клінічне вимірювання стало цінним інструментом у діагностиці дисфункції щитовидної залози.

Вимірювання антитіл до ТПО проводили в минулому за допомогою пасивної гемаглютинації (ПГА). Тести ПГА не чутливі до імуноферментного аналізу і обмежені суб'єктивною інтерпретацією. Ця процедура з підвищеною чутливістю EIA, дозволяє виявити субклінічні рівні антитіл до ТПО. Крім того, результати кількісно визначаються спектрофотометром, що виключає суб'єктивну інтерпретацію.

Методика імуноферментного аналізу мікропланшетів забезпечує техніку оптимальною чутливістю, не вимагаючи технічних маніпуляцій. У цьому методі в мікропланшетну лунку спочатку додають сироватку, розбавлений зразок пацієнта або контроль. Спочатку додають біотинільований антиген тиреоїдної пероксидази (ТПО), а потім змішують реагенти. Результати реакції між аутоантитілами до ТПО і біотинільованим ТПО утворюють імуний комплекс, який осаджують на поверхню лунок, покритих стрептавідином, через високу схожість реакції біотину і стрептавідину.

Після завершення необхідного періоду інкубації, аспірація або декантация відділяє реагенти, які не прикріплені до лунок. Потім додають ферментний анти-людський IgG кон'югат, щоб дозволити кількісне визначення реакції через взаємодію з людським IgG імуного комплексу. Після промивання активність ферменту визначають реакцією з субстратом для отримання кольору.

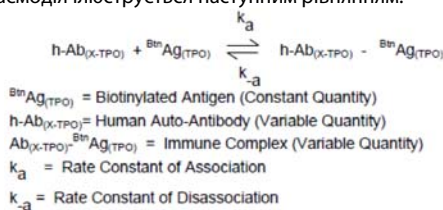
Використання декількох послань на сироватку відомої активності антитіл дозволяє конструювати графік активності ферментів і антитіл. Від порівняння до кривої доза-відповідь, активність ферменту невідомого зразка може корелювати з рівнем аутоімуних антитіл.

3. ПРИНЦИП

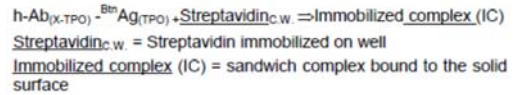
Послідовний метод ELISA (ТИП 1)

Реагенти, які необхідні для послідовного аналізу ELISA: іммобілізований антиген, циркулююче аутоантитіло та ферментно-зв'язані специфічні антитіла. У цій процедурі, іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні мікропланшетної лунки за допомогою взаємодії стрептавідину, покритого в лунці, і екзогенного доданого антитіла до пероксидази щитоподібної залози.

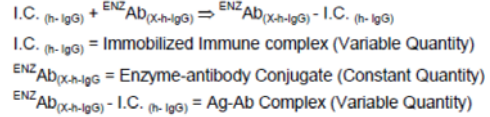
Після змішування біотинільованого антигену і сироватки, що містить аутоантитіло, реакція між антигеном і антитілом утворює імуний комплекс. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Одночасно, комплекс вноситься в свердловину за допомогою високої схожої реакції стрептавідину і біотинільованого антигену. Цю взаємодію проілюстровано нижче:



Після процесу інкубації, лунка промивається, для того, щоб відокремити незв'язані компоненти аспіруванням і/або декантациєю. Потім у мікролунки додається ферментно зв'язане специфічне антитіло (анти-h-IgG). Цей кон'югат зв'язується з імуним комплексом, який сформувався.



Анти-h-IgG ферментний кон'югат, що зв'язується з імуним комплексом у другій інкубації, відокремлюється від матеріалу, який не вступив у реакцію на етапі промивання. Активність ферменту у цій фракції прямо пропорційна до концентрації антитіла у зразку. Використовуючи кілька різних сироваткових референтів відомої активності антитіла, можна сформувану референтну криву, з якої можна встановити активність антитіла невідомої.

4. РЕАГЕНТИ

A. А. х-ТПО Калібратори – 1.0 мл/флакон, А-F

Шість (6) флаконів референтної від анти-ТПО на рівнях 0(A), 25 (B), 50(C), 100(D), 250(E) та 500(F) МОД/мл. Зберігати при температурі 2°C - 8°C. Додано консервант.

Примітка: Калібратори, на основі людської сироватки, були прокалібровані з використанням референтного препарату, який був проаналізований відповідно до Міжнародного Стандарту 66/387 для антитиреоїдної мікросоми.

B. ТПО Біотин Реагент – 13 мл/флакон

Одна (1) флакон біотинільований антиген тиреоїдної пероксидази, стабілізований у буферній матриці. Додано консервант. Зберігати при 2°C - 8°C.

C. Реагент ферменту-антигену анти-ТПО – 13 мл/флакон

Один (1) флакон кон'югату анти-людського IgG- пероксидази хрому (HRP) стабілізованого у буферній матриці. Був доданий консервант. Зберігати при температурі від 2°C до 8°C.

D. Мікропланшет покритий стрептавідином – 96 лунок

Один мікропланшет на 96 лунок покритих стрептавідином і упакованих у пакет із фольги з осушувачем. Зберігати при температурі 2°C - 8°C.

E. Розчинник для сироватки – 20 мл

Один (1) флакон розчинника сироватки, який містить буферні солі та жовтий барвник. Зберігати при температурі від 2°C - 8°C.

F. Концентрат миючого розчину – 20 мл

Один (1) флакон, що містить поверхнево-активну речовину в буферному соляному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2°C - 8°C.

G. Субстрат А – 7 мл/флакон

Одна (1) пляшка, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) у буфері. Зберігати при температурі 2°C - 8°C.

H. Субстрат В – 7 мл/флакон

Одна (1) пляшка, що містить перекис водню (H₂O₂) у буфері. Зберігати при температурі 2°C - 8°C.

I. Стоп розчин – 8 мл/флакон

Один (1) пляшка, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при температурі 2°C - 8°C.

J. Інструкції

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Примітка 2: Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів за умови зберігання при температурі від 2°C - 8°C. Стабільність набору та компоненту вказана на етикетці.

Примітка 3: вищезазначені реагенти призначені тільки для мікропланшета на 96 лунок.

4.1 НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Піпетки для внесення об'ємів 10, 25 та 50 мкл з точністю більше ніж 1.5%.
2. Диспенсери для повторного внесення об'ємів 0.100 мл та 0.350 мл з точністю більше ніж 1.5%.
3. Мікропланшетні промивачі або флакон з віджимом (додатково).
4. Мікропланшетний зчитувач зі здатністю поглинання довжини хвилі при 450 нм та 620 нм.
5. Абсорбуючий папір для витирання лунок.

6. Пластмасова обгортка або мікропланшетна кришка для етапу інкубації.
7. Вакуумний аспіратор (додатково) для етапів промивання.
8. Тестові пробірки для розведення зразків пацієнта.
9. Таймер.
10. Матеріали для контролю якості.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Для *in vitro* використання.

Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах.

Всі продукти, що містять людську сироватку, були протестовані FDA схваленими реагентами та виявилися негативними до Гепатиту В поверхневого антигену, ВІЛ 1 / 2 та ВГС антитіл. Оскільки, жоден відомий тест не може забезпечити повну гарантію, щодо відсутності інфекційних агентів, всі продукти людської сироватки повинні оброблятися як потенційно небезпечні і здатні передавати захворювання. Лабораторні процедури для обробки продуктів крові можна знайти в Центрі Контролю Хвороби / Національному інституті охорони здоров'я, "Біобезпека в мікробіологічних і біомедичних лабораторіях", 2-е видання, 1988, публікація NNS (CDC) 88-8395.

Безпечне видалення компонентів комплексу повинно відповідати місцевим встановленим вимогам.

6. ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

Зразки повинні бути кров'ю; необхідно робити забір за типом сироватки або плазми, а також дотримуватися звичайних заходів безпеки при заборі зразків шляхом венепункції.

Для точного порівняння зі встановленими нормами величин слід збирати зразки сироватки натщесерце. Кров повинна бути зібрана в просту пробірку для венепункції з червоним верхом без добавок або антикоагулянтів (для сироватки) або вакуумних пробірок, що містять ЕДТА або гепарин. Дайте крові згуститися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відділити сироватку або плазми від клітин.

Зразки можна охолодити до температури 2 °С - 8 °С максимум на п'ять (5) днів.

Якщо зразки не використали на протязі цього періоду, то їх можна зберігати при температурі -20 °С до 30 днів. Уникайте повторного заморожування і розмороження.

Щоб провести повторний аналіз, потрібно 0.5 мл зразка.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контролю на рівнях в нормальному, граничному та підвищеному діапазоні, щоб моніторити ефективність аналізу. Ці контролю повинні розглядатися як невідомі, а значення, визначені в кожній виконуваний процедурі тестування. Для забезпечення ефективності даних реагентів слід підтримувати діаграми контролю якості. Для встановлення тенденцій слід застосовувати відповідні статистичні методи.

Індивідуальна лабораторія повинна встановити прийнятні межі продуктивності аналізу. Крім того, максимальна абсорбція повинна відповідати минулому досвіду.

Значне відхилення від встановлених показників може свідчити про непомітну зміну експериментальних умов або деградацію реагентів набору. Свіжі реагенти повинні використовуватися для визначення причини цих змін.

8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Розчинник сироватки

Розведіть розчинник сироватки до 200 мл у зручному контейнері дистильованою або деіонізованою водою. Зберігати при температурі 2 °С - 8 °С.

2. Промивний буфер

Розчиніть вміст миючого концентрату до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою у зручному контейнері для зберігання. Зберігати при температурі 2 °С - 30 °С при кімнатній температурі 20-27 °С до 60 днів.

3. Робочий розчин субстрату

Вилийте вміст флакона, позначеного розчином «А», у прозорий флакон, позначений як розчин «В». Поставте жовту кришку на прозору пробірку для легкого розпізнавання. Змішайте і підпишіть відповідним чином, зберігати при 2 °С - 8 °С.

Примітка: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він виглядає синім.

4. Розведення зразка пацієнта (1/100)

Додайте 0.010 мл (10мкл) кожного зразка пацієнта у 1 мл розчинника сироватки. Накрийте, покрутіть або ретельно перемішайте за допомогою інверсії. Зберігати при температурі 2 °С - 8 °С до сорока восьми (48) годин.

Примітка: не використовуйте реагенти, які забруднені або в яких розвиваються бактерії.

9. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ

Перед початком аналізу доведіть усі реагенти, сироваткові референти та контролю до кімнатної температури (20 °С - 27 °С).**
*Процедуру тестування повинна проводити спеціально навчена людина.***

1. Підготуйте мікропланшетні лунки для кожної референтної сироватки, контролю або розведеного зразка пацієнта, який потрібно аналізувати в дублікаті. *Не використані смужки покладіть назад в упаковку, запакуйте герметично і зберігайте при температурі 2 °С - 8 °С.*
2. Піпетуйте 0.025 мл (25 мкл) відповідної референтної сироватки, контролю або розведеного зразка пацієнта у позначені лунки.
3. Додайте 0.100 мл (100мкл) ТРО біотинового реагенту.
4. Обережно покрутіть мікропланшет протягом 20-30 секунд, щоб перемішати та накрити.
5. Інкубуйте протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст мікропланшета декантацією або аспірацією. У випадку декантації витріть планшет абсорбуючим папером.
7. Додайте 350 мкл промивного буферу (див. розділ «Підготовка реагентів»), декантуйте (видаліть і промийте) або аспіруйте. Повторіть два (2) додаткових рази, щоб загалом було три (3) промивання.
Можна використовувати автоматичний або ручний планшетний промивач. Для відповідного використання дотримуйтеся інструкцій виробника. При використанні пляшки з віджимом, заповніть кожну лунку натиснувши на контейнер (уникаючи повітряних бульбашок), щоб виконати миття.
8. Додайте 0.100 мл (100 мкл) x-ТРО ферментного реагенту до усіх лунок.
Завжди додавайте реагенти у тому ж самому порядку, щоб мінімізувати різницю часу реакції між лунками.
НЕ ТРЯСІТЬ ПЛАНШЕТОМ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТУ.
9. Інкубуйте протягом тридцяти (30) хвилин при кімнатній температурі.
10. Повторіть етапи (6 та 7) як описано вище.
11. Додайте 0.100 мл (100 мкл) Розчину Робочого Субстрату в усі лунки (див. розділ «Підготовка реагенту»).
Завжди додавайте реагенти у тому самому порядку, щоб мінімізувати різницю часу реакції між лунками.
НЕ ТРЯСІТЬ ПЛАНШЕТОМ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ.
12. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом п'ятнадцяти (15) хвилин.
13. Додайте 0.050мл (50 мл) стоп розчину у кожну лунку і обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд.
Завжди додавайте реагенти у тому самому порядку щоб мінімізувати різницю часу реакції між лунками.
14. Зчитуйте абсорбцію у кожній лунці при 450 нм мікропланшетним зчитувачем (використовуючи референтну довжину хвилі 620-630 нм, щоб мінімізувати коливання).

Результати потрібно зчитати протягом тридцяти (30) хвилин після додавання стоп розчину.

Примітка: Для проведення повторного аналізу зразків з концентрацією вищою ніж 500 МОд/мл, додатково розведіть зразок 1:5 або 1:10 використовуючи оригінальний матеріал для розведення. Помножьте на фактор розведення, щоб отримати концентрацію зразка.

10. ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Референсна крива використовується для визначення концентрації анти-ТРО у невідомих зразках.

1. Запишіть абсорбцію отриману з роздруківки мікропланшетного зчитувача, як вказано у Прикладі 1.
2. На лінійно графічному папері позначіть точками абсорбцію для кожного дублікату референтної сироватки проти відповідної активності анти-ТРО у МО/мл.
3. Проведіть оптимальну криву через позначені точки.
4. Щоб визначити рівень активності анти-ТРО для невідомого, знайдіть середню абсорбцію дублікатів для кожної невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитайте концентрацію (в МО/мл) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можуть бути середні, як зазначено). У наступному прикладі, середня абсорбція (1.3239 перетинає криву при 200 МО/мл концентрації анти-ТРО) (див. Мал.1).*

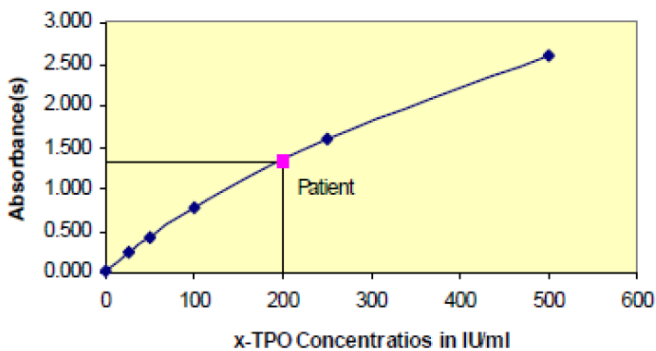
Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для відновлення даних, призначене для аналізів ELISA, також може використовуватися для зменшення даних. У разі використання такого програмного забезпечення слід перевірити достовірність програмного забезпечення.

ПРИКЛАД 1

Зразок	№ лунки	Абс (А)	Середнє Абс (В)	Значення (МО/мл)
Кал А	A1 B1	0.022 0.030	0.026	0
Кал В	C1 D1	0.240 0.247	0.244	25
Кал С	E1 F1	0.437 0.422	0.430	50
Кал D	G1 H1	0.795 0.782	0.788	100
Кал E	A2 B2	1.610 1.572	1.590	250
Кал F	C2 D2	2.659 2.533	2.600	500
Пацієнт	E2 F2	1.294 1.351	1.323	200

*дані представлені у прикладі 1 та мал. 1 тільки для ілюстрації і **не повинні** використовуватися замість стандартної кривої підготовленої з кожним аналізом.

МАЛЮНОК 1



11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Для того, щоб результати аналізу вважалися дійсними потрібно дотримуватися наступних критеріїв:

1. Абсорбція (ОЩ) калібратора F повинна становити ≥ 1.3 .
2. Чотири із шести півів контролю якості повинні бути в межах встановлених діапазонів.

12. РИЗИКИ АНАЛІЗУ

12.1 Проведення аналізу

1. Важливим є те, щоб час реакції у кожній лунці був стабільним для відтворення результатів.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути зміни аналізу.
3. Не потрібно використовувати високоліпемічні, гемолізовані та сильно забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше ніж один (1) планшет, потрібно будувати ще одну криву.
5. Додавання розчину субстрату провокує кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп розчину. Тому, додавати субстрат та стоп розчин у тій самій послідовності, щоб усунути будь-яке відхилення в часі під час реакції.
6. Планшетні зчитувачі вимірюють вертикально. Не торкайтеся дна лунки.
7. Неправильне видалення розчину при аспірації або декантації на етапі промивання може призвести до неточних результатів.
8. Використовуйте компоненти одного лоту. Не перемішуйте реагенти з різних партій.
9. Дуже високі концентрації анти-ТРО у зразках пацієнтів, можуть відразу забруднювати зразки, дотримуючись високих рівнів. Погані дублікати вказують на перехресне забруднення. Повторіть будь-який зразок, який показує вище 3.0 одиниць абсорбції.
10. Важливим є точне піпетування, а також дотримання точних вимог щодо часу та температури. Будь-яке відхилення від цих інструкцій може призвести до неточних результатів.
11. Щоб забезпечити відповідність та належне використання пристрою, потрібно чітко дотримуватися усіх додатних національних стандартів, правил та законів, включаючи належні лабораторні процедури.
12. Важливо відкалібрувати все обладнання, наприклад, Піпетки, Зчитувачі, Промивачі та / або автоматизовані інструменти, що використовуються з цим пристроєм, і виконувати звичайне профілактичне обслуговування.
13. Аналіз ризиків - згідно вимоги CE Mark IVD Директива 98/79 / ЕС для

цього та інших пристроїв, виготовлених DRG, можна отримати за запитом по електронній пошті від DRG на drg@drg-diagnostics.de.

12.2 Інтерпретація

1. Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитися спеціально навченими професіоналами.
2. Результати лабораторних досліджень є лише одним із аспектів визначення лікування пацієнтів і не повинні бути єдиною основою для лікування, особливо якщо результати конфлікують з іншими детермінантами.
3. Для достовірних результатів випробувань, відповідні контролю та інші параметри повинні бути в межах перелічених діапазонів і вимог аналізу.
4. Якщо тестові набори змінені, наприклад перемішані частини різних наборів, то це може дати помилкові результати. DRG не несе за це відповідальність.
5. Якщо для інтерпретації результатів випробування використовується комп'ютерне скорочення даних, необхідно, щоб прогнозовані значення для калібраторів були в межах 10% від встановлених концентрацій.
6. Наявність аутоантитіл до ТРО підтверджується, коли рівень сироватки перевищує 40 МО/мл. При оцінці стану щитовидної залози слід використовувати клінічну значимість результату в поєднанні з анти-тиреоглобуліновою активністю. Однак клінічні висновки не повинні базуватися виключно на цьому тесті, а скоріше як доповнення до клінічних проявів пацієнта та інших відповідних тестів.

13. ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Для визначення очікуваних значень для анти-ТРО ELISA тестової системи було проведено дослідження населення нормального типу. Кількість (n), середнє значення (x) та стандартне відхилення (σ) наведені у Таблиці 1. Значення, що перевищують 40 МО/мл, вважаються позитивними на наявність анти-ТРО аутоантитіл.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для анти -ТРО ELISA Тест Система (у МО/мл)

Кількість	100
Середнє значення	17.6
Стандартне відхилення	10.8
Рівень вище 95% (+2 σ)	39.2

Важливо пам'ятати, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за даним методом для популяції «нормальних» осіб, залежить від множинності факторів: специфіки методу, населення, яке досліджується і точність методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених Виробником, доки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи цей метод, для корінного населення області, де знаходиться лабораторія.

14. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність в аналізі та між аналізами ТРО Ab ELISA тест-системи визначали за допомогою аналізів на трьох різних рівнях півів контрольних сироваток. Кількість (N), середнє значення (X), стандартне відхилення (σ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 2 і Таблиці 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (значення у % Од)

Зразок	К-сть	X	σ	КВ
Пул 1	20	25.5	1.5	5.7%
Пул 2	20	120.5	4.6	3.8%
Пул 3	20	352.4	14.8	4.2%

ТАБЛИЦЯ 3*

Точність між аналізами (значення у % Од)

Зразок	К-сть	X	σ	КВ
Пул 1	10	26.5	1.8	6.8%
Пул 2	10	118.5	5.3	4.5%
Пул 3	10	365.4	22.5	6.2%

*як було виміряно у десяти дублікатах протягом десятиденного періоду.

14.2 Чутливість

ТРО Ab ELISA має чутливість 0.92 МО/мл.

Чутливість (межа виявлення) була встановлена шляхом визначення мінімальної калібратора 0 МО/мл та використання статистики 2 σ (95% достовірності) для розрахунку мінімальної дози.

14.3 Точність

ТРО Ab ELISA порівнювали з референтним мікропланшетом анти-ТРО ELISA. Для цього використовувалися біологічні зразки зі здорових і хворих пацієнтів. Серед хворих пацієнтів були виявлені: тиреоїдит Хашимото, хвороба Грейвса, вузли щитоподібної залози, а також карцинома щитовидної залози. Загальна кількість цих зразків становила 82. Загальна кількість таких зразків становила 82. Найменше квадратне рівняння регресії та коефіцієнт кореляції були розраховані для методу анти-ТРО ІФА у порівнянні з референтним методом. Отримані дані відображені в Таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє значення (x)	Аналіз	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	122.9	$Y=1.02(x) - 5.1$	0.989
Референтний	127.0		

14.4 Специфічність

Взаємодія з ANA, DNA, антитілами тиреоглобуліну (Tg) та ревматоїдному фактору виявилися незначними.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

