

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Руководитель Департамента  
государственного контроля  
лекарственных средств и  
медицинской техники МЗ РФ  
\_\_\_\_\_ В.Е. Акимочкин  
«25» марта 2003 г.

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

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа Комитета  
по новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 9 от 21 октября 2002 г.)

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов ТироидИФА-атТПО предназначен для количественного определения содержания аутоантител к тироидной пероксидазе в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Аутоантитела (АТ) к тироидной пероксидазе (ТПО) относятся в основном к иммуноглобулинам класса G и реже— к иммуноглобулинам класса M. ТПО является ферментом, играющим ключевую роль в процессе синтеза тироидных гормонов. В сыворотке крови здоровых лиц АТ к ТПО могут содержаться в концентрации до 30 Ед/мл. Превышение этого порога свидетельствует об аутоиммунном процессе, как правило, приводящем к нарушению функции щитовидной железы, в основном, за счет снижения секреции тироксина. Определение АТ к ТПО в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики аутоиммунных тиреоидных заболеваний (идиопатическая микседема, тиреоидит Хашимото, диффузный токсический зоб).

**1.3.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

**Примечание:** В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

## **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

Набор позволяет определять АТ к ТПО, принадлежащие к иммуноглобулинам класса G. На первой стадии анализа АТ к ТПО, содержащиеся в калибровочных и исследуемых пробах, связываются с тироидной пероксидазой, иммобилизованной на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизованные АТ к ТПО взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству АТ к ТПО в исследуемом образце.

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации АТ к ТПО в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании

калибровочного графика рассчитывается концентрация АТ к ТПО в исследуемых образцах.

### **3. СОСТАВ НАБОРА:**

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованной на внутренней поверхности лунок ТПО, маркирован «Стрипы с иммобилизованной ТПО» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по международно-признанному референсному стандарту АТ к ТПО NIBSC 66/387, содержащие известные количества АТ к ТПО; значения концентраций АТ к ТПО в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат антител против IgG человека с пероксидазой, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- аналитический буфер, маркирован «БуферА» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 2 флакона (по 20 мл);
- буфер для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д<sub>1</sub>» — 1 флакон (50 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием АТ к ТПО, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» (1Н соляная кислота) — 1 флакон (14 мл).

### **4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

**4.1.** Специфичность. Использование высокоочищенного ТПО для сенсibilизации стрипов обеспечивает высокую специфичность анализа.

**4.2.** Коэффициент вариации результатов определения АТ к ТПО в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ТироидИФА-атТПО не превышает 8%.

**4.3.** Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» АТ к ТПО — соответствие измеренной концентрации АТ к ТПО предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110.

**4.4.** Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АТ к ТПО в сыворотке крови человека не превышает 10 Ед/мл.

**4.5.** Клиническая проверка. Содержание АТ к ТПО измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 324 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Измеренная концентрация АТ к ТПО не превышала 30 Ед/мл в 99,4% случаев.

**4.6.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций АТ к ТПО, соответствующие нормальным.

### **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

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

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

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 400 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

7.2. Буфер Д<sub>1</sub> готов к использованию.

**7.3.** Перед проведением анализа все исследуемые образцы (за исключением калибровочных проб и КС) должны быть разведены Буфером Д<sub>1</sub> в 100 раз (Образец №1). Если значение АТ к ТПО в исследуемых образцах по предварительным данным превышает значение калибровочной пробы № 6, следует приготовить дополнительное разведение еще в 20раз (Образец № 2).

Разводить сыворотку крови следует только в день проведения анализа. При повторной постановке тех же образцов сывороток необходимо делать новое разведение. Пример подготовки образца сыворотки к анализу:

Образец №1 (разведение в 100раз): 990 мкл Буфера Д<sub>1</sub> и 10 мкл исследуемого образца.

Образец №2 (дополнительное разведение в 20 раз): 190 мкл Буфера Д<sub>1</sub> и 10 мкл образца №1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

**7.4.** Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение времени не менее 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.5.** Промывочныйбуфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10 раз. Например: 5 мл Буфера Р + 45 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.6.** Конъюгат Е готов к использованию.

**7.7.** Буфер А готов к использованию.

**7.8.** Раствор ТМБ готов к использованию.

**7.9.** Стоп-реагент готов к использованию.

## **8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**8.1.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На последней странице приведена схема проведения анализа.

**8.2.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;  
B1, B2 — № 2 для калибровочной пробы № 1;  
C1, C2 — № 3 для калибровочной пробы № 2;  
D1, D2 — № 4 для калибровочной пробы № 3;  
E1, E2 — № 5 для калибровочной пробы № 4;  
F1, F2 — № 6 для калибровочной пробы № 5;  
G1, G2 — № 7 для калибровочной пробы № 6;  
H1, H2 — № 8 для контрольной сыворотки.

8.3. Во все лунки, кроме лунок А1 и А2, внести по 100 мкл Буфера А.

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

8.5. Инкубировать стрипы в течение 1 часа при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.5, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.7. Во все лунки, кроме лунок А1 и А2, немедленно внести по 120 мкл конъюгата Е.

8.8. Инкубировать стрипы согласно п. 8.5.

8.9. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки согласно п.8.6.

8.10. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.11. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реактанта для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минуты.

8.12. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину  $B$  — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить калибровочный график зависимости  $B$  (ед. опт. плотн.) от концентрации АТ к ТПО в калибровочных пробах (Ед/мл).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой  $B - B_T$ , где  $B_T$  — среднее арифметическое значение оптической плотности лунок А1 и А2.

Определить содержание АТ к ТПО в пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию АТ к ТПО умножить на фактор разведения.

**В случае дополнительного разведения исследуемых образцов следует иметь в виду, что по причине гетерогенности антител к ТПО для некоторых образцов линейный характер изменения концентрации при разведении может нарушаться.**

8.13. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п.8.11, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение не более **20 минут** при температуре +2...8°C.

## 9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Набор ТироидИФА-атТПО должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток. Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- конъюгат антител против IgG человека, раствор ТМБ и буфер Д<sub>1</sub> после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C);
- БуферА, БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

9.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную и мутную сыворотку.

9.3. Пробы сыворотки крови хранить при температуре +2...8°C не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения — при температуре -20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации АТ к ТПО в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

**По вопросам качества набора «ТироидИФА-атТПО» обращаться по адресу: 189650, г.Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 596-67-80, или в ИГКЛС ФГУ «НЦ ЭСМП» МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14 А, тел. (095) 120-60-95.**

### СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48	

Буфер А, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
КП № 1, мкл	–	50	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	50	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	50	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	50	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	50	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	50	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	50	–
С <sub>х</sub> , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
Инкубация № 1		1 час, термостатируемый шейкер, +37°C							
5-кратная промывка:	5х	5х	5х	5х	5х	5х	5х	5х	5х
промывочный буфер, мкл	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Конъюгат Е, мкл	–	120	120	120	120	120	120	120	120
Инкубация № 2		1 час, термостатируемый шейкер, +37°C							
5-кратная промывка:	5х	5х	5х	5х	5х	5х	5х	5х	5х
промывочный буфер, мкл	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 3		КТ, темное место, 15–30 минут							
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание		Шейкер, 1–2 минуты							
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов		Фотометр, 450 нм							
Расчет результатов		Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа							

**Примечания:**

*КП* — калибровочная проба;

*КС* — контрольная сыворотка;

*С<sub>х</sub>* — анализируемые пробы;

*ОП* — оптическая плотность;

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

---

Инструкция составлена:

В.А. Головаченко, зав. лабораторией биотехнологий ЗАО «Алкор Био»;

Д.Г. Полынцевым, ген. директором ЗАО «Алкор Био»;

Н.Н. Ткаченко, сотрудником НИИАГ им. Д.О. Отта РАМН.