

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення аутоантитіл до тироїдної пероксидази
«анти-ТПО–БЕСТ»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «анти-ТПО–БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення концентрації аутоантитіл до тироїдної пероксидази (ТПО) у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «анти-ТПО–БЕСТ» рекомендований для проведення аналізу в дублікатах 40 невідомих, 6 калібрувальних проб, однієї проби контрольної сироватки й однієї проби для визначення оптичної густини розчину тетраметилбензидину (ТМБ) при використанні всіх стрипів одночасно. У випадку дробового застосування необхідна обов'язкова постановка всіх каліброваних проб для кожного окремого аналізу.

2. СКЛАД НАБОРУ

- **планшет** полістирольний з іммобілізованою ТПО - 1 шт.;
- **кон'югат** моноклональних антитіл до IgG людини з пероксидазою хрому – 1 фл. 16 мл;

Калібрувальні проби (КП)

- **КП 1** (калібрувальна проба №1) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 0 МО./мл атТПО
- **КП 2** (калібрувальна проба №2) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 25 МО./мл атТПО;
- **КП 3** (калібрувальна проба №3) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 50 МО./мл атТПО;
- **КП 4** (калібрувальна проба №4) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 100 МО./мл атТПО;
- **КП 5** (калібрувальна проба №5) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 500 МО./мл атТПО;
- **КП 6** (калібрувальна проба №6) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 1000 МО./мл атТПО
- **КС** (контрольна сироватка) містить відому кількість атТПО – 1 флакон, 0,5 мл діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону – 1 флакон;
- **Промивочний розчин** – 2 фл.;
- **PPC 1** (Розчин для розведення сироватки крові) – 1 фл.;
- **PPC 2** (Розчин для розведення сироватки крові) – 1 фл.;
- **стоп-реагент** – 1 фл.;
- **ТМБ** (розчин тетраметилбензидину) – 1 фл.,

3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

3.1. Чутливість не перевищує 0,5 МО/мл.

3.2. Специфічність. Використання ТПО з високим ступенем очищення для іммобілізації мікропланшетів забезпечує проведення високоспецифічного аналізу, що обумовлює достатню діагностичну ефективність дослідження для використання в алгоритмі диференціальної діагностики захворювань щитовидної залози.

3.3. Діапазон очікуваних значень. В нормі у дорослих 0 – 30 МО/мл.

4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не піпетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

5. ОБЛАДНАННЯ Й МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ:

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5- 3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

6. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ.

6.1. Узяття крові для аналізу слід проводити з використанням стандартних процедур для вен озної крові, а зразки сироватки повинні бути звільнені від клітин крові центрифугуванням. Після центрифугування сироватка крові повинна бути перенесена в окрему пробірку. Слід уникати використання в аналізі плазми крові, гемолізованої, мутної або гіперліпемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

6.2. Зразки сироватки крові слід використати протягом 24-48 годин з моменту отримання за умови їх зберігання при +2...8°C. Для більш тривалого зберігання зразки необхідно заморозити при температурі нижче - 20°C. Уникати повторного заморожування зразків.

7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗІВ

7.1 Підготовка реагентів

7.1.1 Стрипи . Перед розкриттям пакет зі стрипами необхідно витримати при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) не менше 30 хвилин. Розкрити пакет і переставити на вільну рамку необхідну кількість стрипів. Залишок упакувати у фольгований пакет та зберігати до кінця терміну придатності при +2...8°C.

7.1.2 Рідкі калібрувальні проби і контрольна сироватка готові до використання.

Для відновлення ліофілізованих калібрувальних проб та контрольної сироватки перед розкриттям флаконів

легким постукуванням струсити частинки, які прилипли до стінок флаконів або до кришок. Відкрити флакони і покласти кришки перевернутими на суху поверхню. У кожному флакон з калібрувальної пробі та контрольної сироваткою внести по 0,5 мл дистильованої води і закрити кришками. Витримати флакони протягом 10 хвилин при кімнатній температурі без перемішування. Потім, акуратно нахилиючи і обертаючи флакони, перемішати їх вміст до повного розчинення, уникаючи піноутворення. Протягом наступних 10 хвилин витримати флакони при кімнатній температурі, періодично перемішуючи.

7.1.3 Кон'югат готовий до використання. Витрата кон'югату на один стрип становить 1,3 мл

7.1.4 РРС 1 готовий до використання. Витрата РРС 1 на один стрип становить 1,15 мл.

7.1.5 РРС 2 (Розчин для розведення сироватки крові) готовий до використання.

7.1.6 Розчин для промивання. Необхідна кількість промивочного розчину розвести дист. водою в 20 разів.

Наприклад:

5 мл промивочного розчину + 95 мл дистильованої води. Ретельно перемішати, уникаючи піноутворення.

7.1.7 Розчин тетраметілбензідіна (ТМБ) готовий до використання. Витрата ТМБ на один стрип становить 1,15 мл.

7.1.8 Стоп - реагент готовий до використання. Витрата стоп- реагенту на один стрип становить 1,15 мл.

7.1.9 Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути ретельно перемішані і доведені до кімнатної температури.

7.1.10 Розведення досліджуваних зразків сироваток крові. Перед проведенням аналізу усі досліджувальні зразки (за виключенням калібровочних проб та контрольної сироватки) повинні бути розведені РРС 2 в 100 разів. (Зразок №1). Якщо за результатами аналізу (див. п. 9.3) значення концентрації АТ до ТПО в досліджуваних зразках **вище КП № 6**, зразки слід розвести РРС 2 в 20 разів (Зразок №2). Приклад підготовки зразка до аналізу

Зразок № 1 (розведення в 100 разів):

990 мкл РРС 2 + 10 мкл досліджуваного зразка.

Зразок № 2 (розведення в 20 разів):

190 мкл РРС 2 + 00 мкл зразка № 1.

При кожному розведенні необхідно ретельне перемішування.

7.2. Постановка аналізу

7.2.1. Скласти протокол маркування лунок. Лунки промаркувати наступним чином:

A1, A2 - № 1 - для вимірювання величини оптичної густини розчину ТМБ;

B1, B2 - № 2 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 1;

C1, C2 - № 3 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 2;

D1, D2 - № 4 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 3;

E1, E2 - № 5 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 4;

F1, F2 - № 6 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 5;

G1, G2 - № 7 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 6;

H1, H2 - № 8 - для вимірювання величини оптичної густини контрольної сироватки

7.2.2 У всі лунки, крім лунок A1 і A2, внести по 100 мкл РРС1.

7.2.3 Внести у відповідні лунки по 10 мкл калібрувальних проб та контрольної сироватки, в інші лунки - по 10мкл досліджуваної сироватки крові в дублікатах.

Примітка: загальний час внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки і досліджуваних сироваток крові не повинен перевищувати 15 хвилин, інакше час інкубації різних зразків буде значно відрізнятися, що призведе до хибних результатів.

7.2.4 Інкубувати стрипи протягом 30 хвилин при струшуванні в термо-шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об/хв. Або 60 хвилин при кімнатній температурі без струшування

7.2.5 По закінченні інкубації видалити вміст лунок в контейнер з дезінфікуючим розчином (1% розчином гіпохлориту натрію або 6% розчином перекису водню) і промити лунки 5 разів. При кожній промивці в усі лунки додати по 300 мкл розчину для промивання, приготованого за п. 7.1.6, струснути рамку протягом 5-10 секунд з наступним декантування. Після останнього декантування ретельно видалити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стрипами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу.

Допускається промивка лунок за допомогою автоматичного промивання пристрою.

7.2.6 У всі лунки, крім лунок A1 та A2, внести по 120 мкл розчину кон'югату.

7.2.7 Інкубувати стрипи протягом 15 хвилин при струшуванні в термо-шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об/хв. Або 30 хвилин при кімнатній температурі без струшування

7.2.8 Після закінчення другої інкубації видалити вміст лунок Декантування і промити лунки згідно п. 7.2.5.

7.2.9 Негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ. Інкубувати стрипи в темноті при кімнатній температурі (+18 ... 25°С) протягом 15-20 хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення або 10 хвилин у термо-шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об / хв .

7.2.10 Додати в усі лунки з тією ж швидкістю і в тій же послідовності, як і розчин ТМБ, по 100 мкл стоп-реагенту для зупинки ферментної реакції, перемішати на шейкері протягом 1-2 хвилин при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С)

7.2.11. Якщо неможливо виміряти оптичну густину у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.10, тоді слід мати на увазі, що забарвлення в лунках планшета стабільна не більше 20 хвилин при температурі +18 ... 25.

Примітка: максимальна оптична густина не повинна перевищувати меж лінійного виміру спектрофотометра. Робочий діапазон спектрофотометра необхідно уточнювати в паспорті приладу. Рекомендована максимальна оптична густина не більше 2,5 од. ОГ

8. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.

Виміряти на фотометрі вертикального сканування оптичну густину у лунках при довжині хвилі 450 нм.
Примітка: середнє арифметичне значення ОГ в лунках А1 та А2 не повинно перевищувати 0,09 од. ОГ.

9. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ.

9.1 Побудувати калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації АТ до ТПО (МО/мл) в калібрувальних пробах (Малюнок). Зовнішній вигляд графіка залежить від способу перетворення вісей.

Примітка: для побудови калібрувального графіка на масштабній папері необхідно використовувати дані оптичної густини після вирахування з них середньої величини оптичної густини лунок з ТМБ.

Якщо програма фотометра не дозволяє віднімати величину оптичної густини лунок А1 і А2, то необхідно користуватися формулою:

$$B - B_T,$$

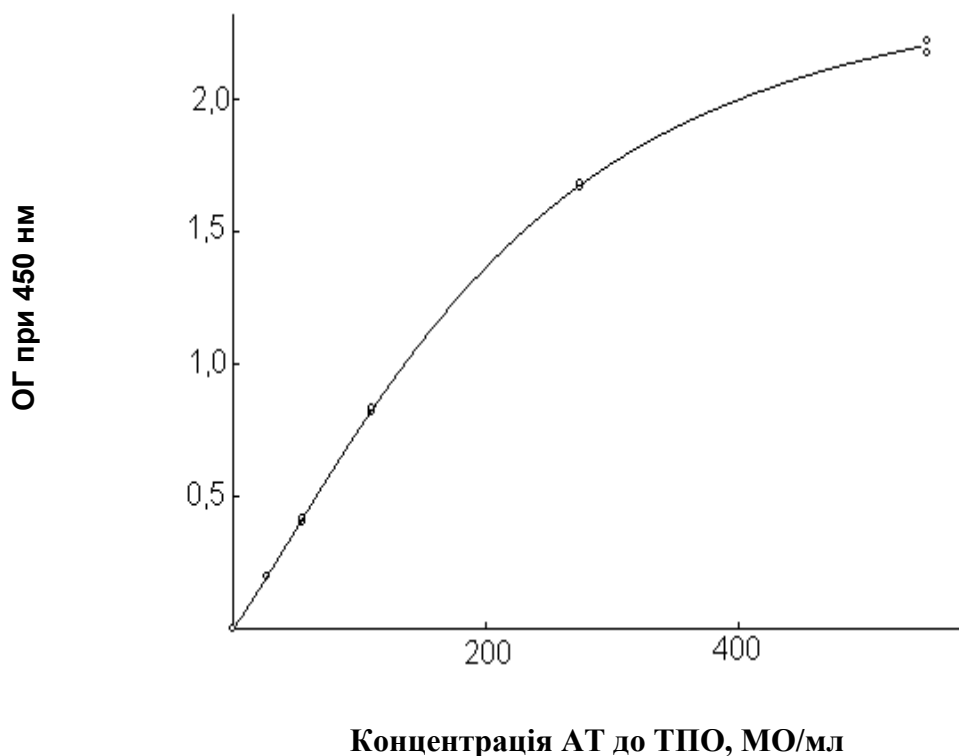
де B - середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках, що містять калібрувальні або досліджувані проби,

B_T - середнє арифметичне значення оптичної густини лунок А1 і А2

9.2. Визначити вміст АТ до ТПО в пробах за калібрувальним графіком. У разі додаткового розведення зразків необхідно виміряну концентрацію АТ до ТПО помножити на коефіцієнт розведення.

Примітка: в разі додаткового розведення досліджувальних зразків треба мати на увазі, що з причини гетерогенності антитіл до ТПО для деяких зразків лінійний характер зміни концентрації може схилити.

9.3. Екстраполяція калібрувального графіка для значень концентрації АТ до ТПО, що перевищують номінал КП № 6, **не допускається!!!**. Для точного визначення концентрації АТ до ТПО в таких зразках необхідно виконати їх розведення у відповідності з п. 7.1.10:



10. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ Й ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ.

11. Набір зберігати і транспортувати при (2-8)°С.

Промиваючий розчин підготовлений до використання зберігати не більше 30 діб.

Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 5 діб. **Не допускати заморожування!**

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися: в **ТОВ «Бест Діагностик»** за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9, тел./факс: (044) 500-57-11 E-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право в разі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.