

甲状腺过氧化物酶自身抗体 ELISA 检测试剂盒使用说明

预期用途

RSR 公司生产的甲状腺过氧化物酶自身抗体(TPOAb)ELISA 检测试剂盒仅用于定量检测人类血清中 TPOAb。需专业技术人员操作。

甲状腺过氧化物酶(TPO)抗体的产生与甲状腺的自身免疫性损伤有关。这些抗体的检测在甲状腺自身免疫疾病诊断及治疗中具有重要的价值。

参考文献

B Rees Smith

Thyroid autoantibodies.

Scand J Clin Lab Invest 2001 61 (suppl 235):45-52

P Burne et al

Point-of-care assays for autoantibodies to thyroid peroxidase and to thyroglobulin.

Thyroid 2005 15: 1005-1010R.

Hewer et al

A sensitive non-isotopic assay for acetylcholine receptor autoantibodies.

Clinica Chimica Acta 2006 364: 159-166

检测原理






RSR 公司的 TPOAb ELISA 检测试剂盒中，标准品、质控品、以及患者血清中的人 TPOAb 将会与 ELISA 微孔板中包被的 TPO 抗原相结合。15 分钟孵育后弃去液体留下与固定抗原结合的抗体。在第二次孵育中，向微孔中加入碱性磷酸酶标记的蛋白 A 用以结合被固定 TPO 结合的 TPOAb。被微孔板结合的碱性磷酸酶标蛋白 A 的量可经由第三次孵育中加入的对硝基苯磷酸二钠发生的显色反应测定。显色反应通过滴加终止液终止，随后在 405nm 下使用酶标仪读取每个微孔内液体的吸光度。吸光值较高提示样品内存在 TPO 抗体。试剂盒测量范围为 10-5000u/mL(NIBSC 66/387)。

待测血清样本的贮存和制备

待测血清应该在分离后迅速进行检测或-20℃分装贮存。每份样本需要 100μL 血清（以两份 50μl 计算）尽量避免反复冻融，防止储存温度过高，不正确的贮存样本会造成抗体活性下降或丢失。避免使用脂血、溶血的样本。研究表明，向从同一受试者获取的含 EDTA、柠檬酸及肝素的血浆以及血清中混入 TPOAb 阳性血清后对比测试，仅有微小变化，可忽略不计。在总共 19 份样本中，4 份预混血浆的样本 OD₄₀₅ 为预混血清样本值的 112%至 121%，且 4 份样本抗体浓度为 747-924u/mL。19 份样本浓度范围为 14-1031u/mL。

需要时，将待测血清回温至室温并轻轻混匀。当血清含有絮状物或者颗粒时，需要离心以去除颗粒物质（推荐速度：10-15000g，离心 5 分钟），请勿省略离心处理步骤。

IFU 符号

| 符号 | 含义 |
|--|-------------|
|  | 欧洲委员会符合性说明书 |
|  | 体外诊断试剂 |
|  | 产品样本号，目录编号 |
|  | 批号 |
|  | 参阅使用说明 |
|  | 生产商 |
|  | 有效日期 |
|  | 阳性质控 |
|  | 阴性质控 |

实验设备

微量加样器：量程分别为 50 μ L 和 100 μ L。

能够按量配给多种体积以复溶或稀释试剂的方法。

EP 管。

纯水。

酶标仪，适用于 96 孔形式，能在 405nm 波长条件下进行检测。

酶标板振荡器，可以 500 次/分钟（水平振荡器）。

ELISA 微孔板盖。

试剂盒组成

将未打开的试剂盒及其所有组份于2-8℃保存。

| | |
|----------|--|
| A | TPO 包被微孔板 每个框架中设 12 个板条，每条 8 孔（共 96 孔），密封保存于箔袋中。开封前提前室温（20-25℃）放置至少 30 分钟。 |
| | 微孔条需与所提供的底架牢固结合。开封后未使用的任何微孔条均应放回原先的箔袋，并以胶带密封。将箔袋置于装有干燥剂的自封式塑料袋中，试剂盒有效期内，2-8℃保存。 |
| B | 结合物(蛋白 A-碱性磷酸酶) 11mL 直接使用 |
| C | 液体底物(pNPP) 11mL 直接使用 |

| | |
|-------------|--|
| D | 终止液 10.5mL 直接使用 |
| E | 检测稀释液 125mL 直接使用 |
| F | 浓缩洗涤液。 125mL |
| | 用纯水进行 10 倍稀释，例如 100mL 浓缩液+900mL 纯水。稀释后，试剂盒有效期内，2-8℃保存。 |
| G1-5 | 标准液 0, 5, 40, 400, 5000u/mL 5×1.0mL 直接使用 |
| H1-2 | 阳性对照 1、2(质控范围详见标签) 2×0.5mL 浓缩液 |
| | 使用检测稀释液（E）按 1:20 比例稀释。例如，50μL（H1-2）+950μL（E）。 |

实验步骤

所有试剂使用前需室温放置(20-25℃)至少 30 分钟；在步骤 5, 8, 9 中建议使用 Eppendorf 连续移液器。

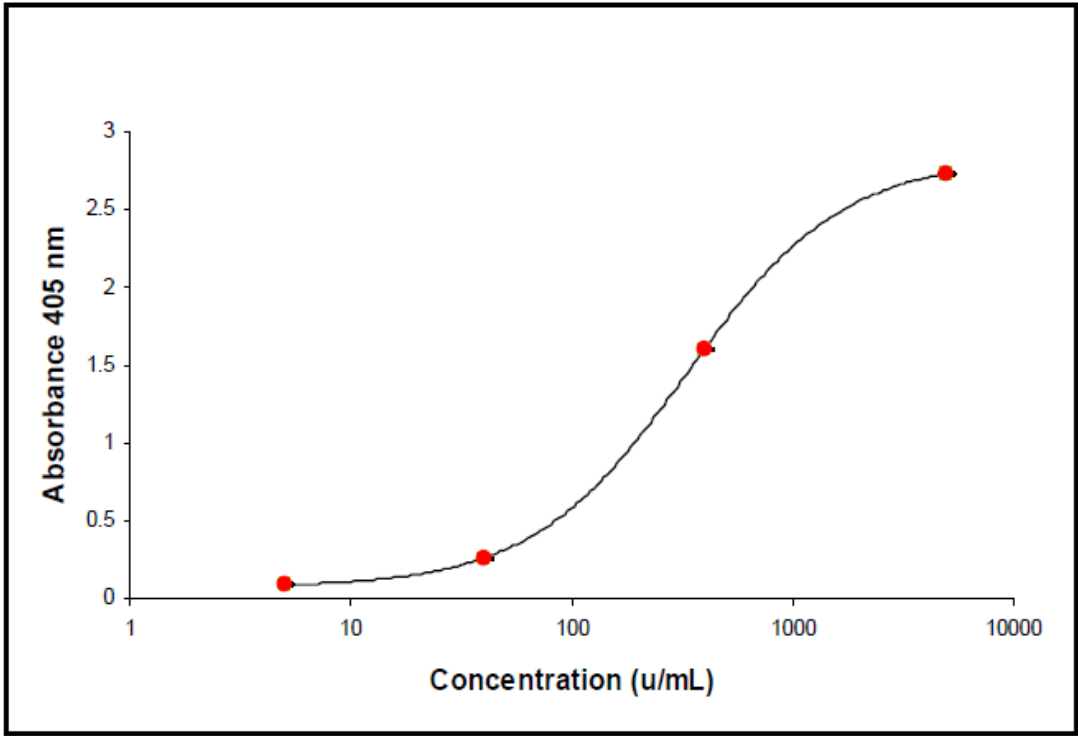
| | |
|-----------|---|
| 1 | 将所有样品和阳性质控品试用稀释液(E)进行 1:20 稀释。例如 50μL 血清使用 950μL 稀释液。请勿稀释标准液。 |
| 2 | 加入 50μL 患者稀释血清，标准品（G1-5）及稀释的质控品（H1-2）到微孔内。留一个空白孔（参见步骤 10）。 |
| 3 | 盖上微孔板盖，在 ELISA 板振荡器（500 次/分）上室温（20-25℃）孵育 15 分钟。 |
| 4 | 用洗板机吸出样本，用稀释的洗涤液（F）抽洗微孔板三次。 |
| 5 | 每孔中加入 100μL 结合物(B)(空白孔除外)。添加过程中应避免液体从微孔中溅出。 |
| 6 | 盖好微孔板，在ELISA板振荡器（每分钟振荡500次）上室温孵育15分钟。 |
| 7 | 重复洗涤步骤 4。 |
| 8 | 每孔（包括空白孔）加入 100μL 液体底物（C），无须振荡室温避光孵育 15 分钟。 |
| 9 | 每孔（包括空白孔）加入 100μL 终止液（D）。确保各微孔底物孵育时间相同。 |
| 10 | 使用酶标仪在405nm波长条件下读取各孔吸光度，空白孔仅有100μL底物（C）和 100μL 终止液（D）。 |

结果分析

绘制标准曲线，X轴为标准品浓度（对数模式），Y轴为标准品OD（线性模式）。患者血清TgAb浓度可通过标准曲线读出（RSR绘制对数/线性4参数曲线）。可采用其他数据处理系统。浓度高于5000u/mL的血清样本可用检测稀释液作进一步稀释，使其进入可检测范围。

举例（仅作参考，不用于实际结果计算）

| 样本 | A450 (减去空白值) | u/mL |
|---------|-----------------|------|
| G1 | 0.020 | 0 |
| G2 | 0.088 | 5 |
| G3 | 0.260 | 40 |
| G4 | 1.607 | 400 |
| G5 | 2.734 | 5000 |
| 阳性对照 H1 | 0.265 | 40 |
| 阴性对照 H2 | 1.156 | 230 |



405nm波长条件下的吸光度浓度（u/mL）

检测临界值

| Cut off | u/mL |
|---------|------|
| 阴性 | <10 |
| 阳性 | ≥10 |

性能评价

临床特异性

使用本试剂盒对199名健康志愿者的血清进行检测，其中189例（95%）TPOAb呈阴性结果。

临床灵敏度

使用本试剂盒对66例桥本氏或格雷夫斯病患者进行了检测，其中50例（76%）TPOAb呈阳性结果。

检测下限

将本试剂盒零点标准品检测20次，计算出平均差和标准差。2倍标准差条件下的检测下限值为1.05u/mL。

批间精密度(n=20)

| 样本 | 平均值u/mL (n=20) | CV (%) |
|----|----------------|--------|
| 1 | 12.3 | 8.1 |
| 2 | 86 | 5.4 |
| 3 | 194 | 6.5 |

批内精密度(n=20)

| 样本 | 平均值u/mL (n=25) | CV (%) |
|----|----------------|--------|
| A | 24 | 6.9 |
| B | 78 | 3.4 |
| C | 352 | 4.8 |

临床准确性

用本试剂盒检测非格雷夫斯病或桥本氏病的身免疫性疾病患者血清，结果显示14%

(n=7) GAD抗体阳性血清, 38% (n=8) 双链DNA抗体阳性血清, 36% (n=11) 乙酰胆碱受体抗体阳性血清, 75% (n=4) 21羟化酶抗体阳性血清以及3% (n=30) 类风湿因子呈阳性的血清，用第2代ElisaRSR™ TPOAb ELISA检测，TPOAb呈阳性结果。

干扰性

当待测样本混有以下物质时，对检测结果并无干扰：500mg/dL以下的血红素；20mg/dL以下的胆红素以及3000mg/dL以下的脂肪乳剂。

本说明书中引用的数据仅供参考。我们推荐每个实验室在检测中建立自己的质控样本模式。同时也应该建立自己的TPO自身抗体的正常值和病原学上有参考意义的检测范围。

安全性

本试剂盒仅供专业人员操作使用，操作时应严格遵守说明书。注意标签上注明的有效期和复溶试剂的稳定性。详细的安全信息参见材料安全数据清单。注意避免可能导致摄入的任何活动。避免皮肤和衣物接触。操作之前穿好防护服。用于本试剂盒中的人源性材料与HIV1, HIV2, HCV抗体，及HBsAg并无反应，且已经得到验证。但我们在处理这些潜在的感染也应多加注意。如果存在污染，我们在离开实验室之前应彻底的洗手。潜在的污染废物包括样本在内，在处理之前应进行灭菌。本试剂盒涉及的非人源性的材料（如来自动物）已经证实均来自健康的动物，但这些物质我们也按潜在的感染源进行处理。试剂盒中有一些组分包括少量叠氮化钠，作为防腐剂。试剂盒中的所有组分避免食入，吸入，注射和直接接触到皮肤、眼睛、衣服。在处理试剂盒组分时，要用大量的水冲洗排水系统，避免形成重金属复合物。

简单操作步骤

| | |
|---------------------------|---|
| 所有试剂和样本在使用前均应达到室温（20-25℃） | |
| 稀释： | 阳性对照品和患者样本按1:20比例稀释（例如，50μL血清加入950μL检测稀释液）。切勿稀释标准品。 |
| 加样： | 50μL标准品、阳性对照品和患者血清（空白孔除外） |
| 孵育： | 室温条件下在ELISA板振荡器（500次/分）上孵育15分钟 |
| 吸出： | 微孔板 |
| 洗涤： | 洗板三次 |
| 加样： | 各微孔（空白孔除外）加入100μL结合物 |
| 孵育： | 室温条件下在ELISA板振荡器（500次/分）上孵育15分钟 |
| 吸出： | 微孔板 |
| 洗涤： | 洗板三次 |
| 加样： | 各微孔（包括空白孔）加入100μL液体底物 |
| 孵育： | 室温避光孵育15分钟，无需振荡 |
| 加样： | 各微孔（包括空白孔）加入100μL终止液 |
| 加入终止液后，30分钟内在405nm读取吸光度 | |