

УТВЕРЖДЕНА

Приказом
Росздравнадзора

От _____ 2011 г.

№ _____

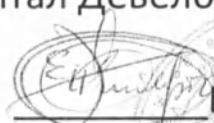
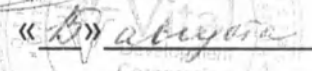
КОПИЯ ВЕРНА
ГЕН. ДИРЕКТОРА
Е.Н. СХОЛЛЬ-ЭНГБЕРТС



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор

ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»


Е.Н. Схолль-Энгбертс
«» _____ 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

АУТОАНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ

В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

(атТГ-Имаксиз (IMAXYZ))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «атТГ-Имаксиз (IMAXYZ)» предназначен для количественного *in vitro* определения концентрации аутоантител к тиреоглобулину (атТГ) в сыворотке крови человека.

1.2. Анти-ТГ антитела в основном относятся к классу IgG и реже – к классу IgA и IgM. От низкого до умеренного уровня анти-ТГ антитела могут быть обнаружены в сыворотке пациентов при аутоиммунных заболеваниях, не связанных со щитовидной железой (например, системная красная волчанка или синдром Шегрена). В некоторых случаях атТГ-положительные сыворотки могут быть отрицательными для другого типа антитиреоидных антител – антител к тиреоидной пероксидазе (атТПО). Совместное определение обоих типов антитиреоидных антител (атТПО + атТГ) обеспечивает большую чувствительность в диагностике аутоиммунных нарушений функций щитовидной железы.

Отдельно от аутоиммунных заболеваний, анти-ТГ антитела могут выявляться у больных, страдающих раком щитовидной железы.

Высокий уровень атТГ у таких пациентов может помешать правильному определению сывороточного тиреоглобулина (ТГ), который служит в качестве опухолевого маркера для контроля эффективности терапии в этой группе больных.

1.3. Превышение допустимого порога по содержанию антител к ТГ может свидетельствовать об аутоиммунном процессе, как правило, приводящем к нарушению функции щитовидной железы. Определение атТГ может быть использовано для диагностики тиреоидита Хашимото (ТХ), первичной микседемы, болезни Грейвса (БГ) или диффузного токсического зоба.

1.4. Набор «атТГ-Имаксиз (IMAXYZ)» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора тетраметилбензидина (ТМБ) при использовании всех стрипов одновременно.

В случае дробного применения необходима обязательная постановка всех калибровочных проб для каждого отдельного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

На первой стадии анализа атТГ, содержащиеся в калибровочных и исследуемых пробах, связываются с высокоочищенным тиреоглобулином человека, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизованные атТГ взаимодействуют с конъюгатом моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими атТГ. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации атТГ в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольных материалах.

После остановки реакции стоп-реагентом (цвет раствора меняется с синего на желтый) и измерения оптической плотности раствора в лунках проводится расчет концентрации атТГ в исследуемых образцах и контрольных материалах по калибровочному графику. Калибровочный график строится на основании результатов анализа

калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

3. СОСТАВ НАБОРА МИКРОПЛАНШЕТ

1 упаковка

Разборный полистирольный микропланшет со стрипами, разделяемыми на отдельные лунки, с иммобилизованным ТГ человека, маркирован «Микропланшет с иммобилизованным ТГ».

КОНЬЮГАТ

1 флакон, 14 мл

Конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат».

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП)

комплект

Аттестованы по стандарту NIBSC IRP 65/093, содержат известные количества антител к ТГ.

КП№1 - 1 флакон, 1,0 мл, содержит 0 МЕ/мл атТГ, маркирован «Калибровочная проба №1».

КП№2 - 1 флакон, 1,0 мл, содержит 50 МЕ/мл атТГ, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3 - 1 флакон, 1,0 мл, содержит 125 МЕ/мл атТГ, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4 - 1 флакон, 1,0 мл, содержит 250 МЕ/мл атТГ, маркирован «Калибровочная проба №4».

КП№5 - 1 флакон, 1,0 мл, содержит 750 МЕ/мл атТГ, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6 - 1 флакон, 1,0 мл, содержит 1500 МЕ/мл атТГ, маркирован «Калибровочная проба №6».

ПРИМЕЧАНИЕ: точные номиналы калибровочных проб указаны на этикетках флаконов и в паспорте к набору реагентов.

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС)

1 флакон, 1,0 мл

Содержит известное количество атТГ, диапазон концентраций указан на этикетке флакона.

РАСТВОР ТМБ

1 флакон, 14 мл

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ

1 флакон, 14 мл

1М соляная кислота (HCL), маркирован «Стоп-реагент».

ПРОМЫВОЧНЫЙ БУФЕР.

2 флакона, 20 мл

Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (20-кратный концентрат), маркирован «Буфер П».

БУФЕР ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ

1 флакон, 50 мл

образцов сыворотки крови,

Водно-солевой раствор, маркирован «Буфер Р».

Дополнительно в состав набора могут входить:

- защитная пленка для микропланшетов;
- пластиковые ванночки для реактивов;
- одноразовые наконечники;
- полиэтиленовый пакет с замком для хранения микропланшета.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация атТГ в сыворотке крови человека не превышает 5 МЕ/мл.

4.2. Специфичность Высокая степень очистки ТГ, используемого для иммобилизации микропланшетов, обеспечивает высокую специфичность анализа, обуславливающую достаточную диагностическую эффективность исследования для использования в алгоритме дифференциальной диагностики заболеваний щитовидной железы.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации атТГ в образцах сыворотки крови при разведении их буфером для разведения образцов, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90 - 110%.

4.4. Точность. Соответствие измеренной концентрации атТГ в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3, составляет 90–110%.

4.5. Коэффициент вариации результатов определения атТГ в одном и том же образце с использованием набора «атТГ-Имаксиз (IMAXYZ)» не превышает 8%.

4.6. Клиническая проверка. При измерении концентрации атТГ в сыворотках крови 200 здоровых лиц в возрасте 20-46 лет, средняя концентрация атТГ не превышала 60 МЕ/мл в 98% случаев.

4.7. При использовании набора в каждой конкретной лаборатории необходимо уточнить значения концентрации атТГ, соответствующие нормальным (ГОСТ Р ИСО 15189).

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Реагенты, входящие в состав набора, предназначены исключительно для лабораторной *in vitro* диагностики.

5.2. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

5.3. В учреждениях, в которых осуществляется работа с наборами реагентов, следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

5.4. Несмотря на то, что производные крови человека, входящие в состав наборов, были проверены на наличие антител к ВИЧ 1 и 2 типа, вирусу гепатита С, а также HBsAg и дали отрицательный результат, необходимо с калибраторами, контрольными материалами обращаться как с образцами, несущими инфекционную опасность, так как ни один существующий метод тестирования не может на 100% гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.5. При работе с исследуемыми образцами пациентов следует соблюдать меры предосторожности как в отношении инфекционно опасного материала. Настоятельно рекомендуется использование одноразовых перчаток и других рекомендованных мер защиты (спецодежду), позволяющих снизить риск инфицирования.

5.6. Все материалы, контактировавшие с образцами крови пациентов, контрольными и калибровочными материалами должны быть инаktivированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при 121°C, замачиванием в 5% растворе хлорамина Б в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом). Жидкие отходы, включая промывочные воды, должны быть инаktivированы добавлением сухого хлорамина Б из расчета 50 г/л в течение 2 часов, либо обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом.

5.7. Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор соляной кислоты и обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и

слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

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

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

- Одно- или многоканальные дозаторы с изменяемым объемом отбора жидкостей в диапазонах 10 – 100 мкл, 50 – 300 мкл для постановки анализа и в диапазонах 100 – 1000 мкл, 1000 – 5000 мкл, 1000 – 10000 мкл для приготовления реагентов.

- Одноразовые сменные наконечники для дозаторов.
- Пробирки для разведения образцов сыворотки крови.
- Ванночки для реактивов для многоканального дозатора.
- Спектрофотометр, позволяющий производить измерение оптической плотности раствора в лунках при 450 нм.

- Термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание при температуре +37°C со скоростью 400 - 650 об/мин.

- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.

- Фильтровальная бумага.

- Цилиндр мерный на 200 мл.

- Стакан стеклянный вместимостью 500 мл.

- Вода деионизованная или дистиллированная.

- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Взятие крови для анализа следует проводить с использованием стандартных процедур для венозной крови, а образцы сыворотки должны быть освобождены от клеток крови центрифугированием. После центрифугирования сыворотка крови должна быть перенесена в отдельную пробирку.

7.2. Следует избегать использования в анализе плазмы крови, гемолизированной, мутной или гиперлипемичной сыворотки.

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азид натрия.

7.4. Образцы сыворотки крови следует использовать в течение 24-48 часов с момента получения при условии их хранения при +2...8°C. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре ниже -20°C. Избегать повторного замораживания образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1 Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

8.2 Предварительное разведение исследуемых образцов.

Перед проведением анализа все исследуемые образцы (за исключением калибровочных проб и контрольной сыворотки) должны быть разведены Буфером Р в 100 раз:

990 мкл Буфера Р + 10 мкл исследуемого образца.

Тщательно перемешать.

Если значения атТГ в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения концентрации калибровочной пробы № 6, образцы следует **дополнительно** развести Буфером Р в 20 раз:

- 190 мкл Буфера Р + 10 мкл предварительно разведенного в 100 раз исследуемого образца. Тщательно перемешать.

Разведение сывороток крови пациентов следует проводить только непосредственно перед проведением анализа. Хранение разведенных образцов не допускается.

8.3 Микропланшет. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение не менее 30 минут во избежание конденсации влаги на поверхности лунок. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов или лунок. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

8.4 Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию

8.5 Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

10 мл Буфера П + 190 мл деионизованной или дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

Готовый к использованию Промывочный буфер хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным 20-кратный «Буфер П» хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

8.6 Конъюгат готов к использованию.

8.7 Раствор ТМБ готов к использованию.

8.8 Стоп-реагент готов к использованию.

8.9 Буфер Р готов к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТМБ	ТМБ	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	КП1	КП1	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	КП2	КП2	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	КП3	КП3	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	КП4	КП4	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	КП5	КП5	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	КП6	КП6	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	КС	КС	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

9.2. Внести в соответствующие лунки (кроме A1 и A2) по 100 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 100 мкл предварительно разведенной исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут.

9.3. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 30 минут в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 400–650 об/мин.

9.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в специальную емкость для сбора инфицированного материала и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 8.5, с последующим удалением жидкости в емкость для инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге до исчезновения следов наличия жидкости в лунках стрипов.

9.5. Во все лунки, кроме A1 и A2 внести по 100 мкл Конъюгата.

9.6. Инкубировать стрипы согласно п. 9.3.

9.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть лунки согласно п. 9.4.

9.8. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

9.9. Остановить ферментную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента. Цвет реакционной смеси в лунках должен измениться с синего на желтый. Встряхнуть на шейкере в течение 1–2 мин для равномерного перемешивания. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности (ОП) не должно превышать 20 минут. Схема проведения анализа приведена в **Таблице 1.**

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

10.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования ОП раствора в лунках при длине волны 450 нм.

10.2. Определить среднее значение ОП в лунках A1 и A2 (контроль ТМБ) и вычесть его из среднего значения ОП калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

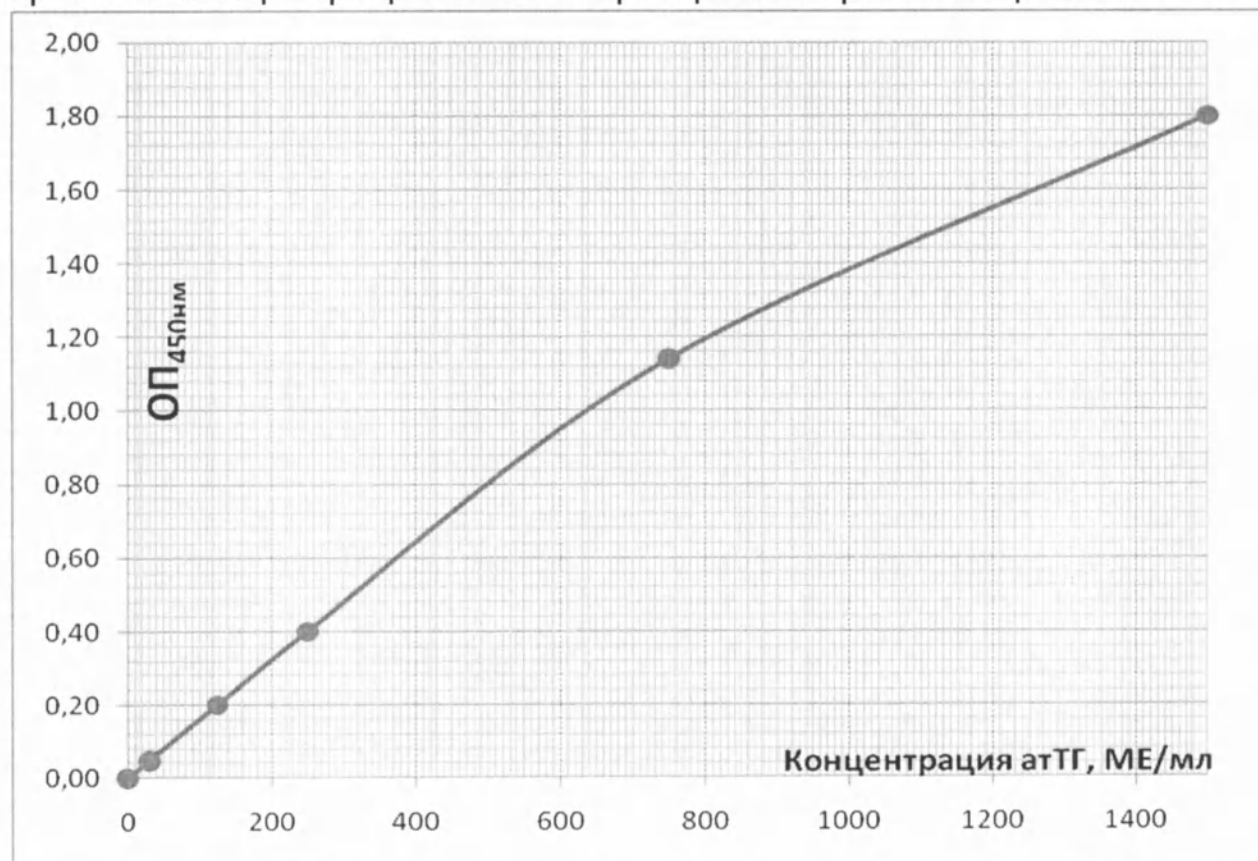
11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках А1 и А2 (контроль ТМБ) не превышает 0,1 ед.ОП.

11.2. В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости ОП (ед.опт.плотн.) от концентрации атТГ в калибровочных пробах (МЕ/мл), используя средние значения ОП дубликатов.

11.3. Определить содержание атТГ в анализируемых образцах по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов. В случае предварительного дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию атТГ умножить на фактор разведения.

Ниже приведен типичный график зависимости ОП калибровочных проб от концентрации в них атТГ. Данный график приведен исключительно в целях иллюстрации и не может быть использован для расчета концентрации атТГ в образцах сывороток пациентов:



12. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА.

12.1. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что

количество независимых экспериментов ограничено объемом калибровочных проб.

12.2. Для каждого независимого эксперимента настоятельно рекомендуется построение нового калибровочного графика и определение концентрации аналита в контрольной сыворотке.

12.3. Не допускается использование реагентов разных серий при проведении анализа, а также использование ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера других фирм-производителей.

12.4. После окончания внесения реагентов необходимо плотно закрыть крышки флаконов и поместить их на хранение при температуре +2...8°C.

12.5. Для диагностических целей результаты теста на антитела к ТГ должны использоваться в сочетании с другими лабораторными данными, общим клиническим представлением врача и другой соответствующей информацией. В низких концентрациях аутоантитела могут встречаться у 10% здорового населения и у пациентов с заболеваниями, не связанными со щитовидной железой.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

13.1. Набор должен храниться и транспортироваться 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 после вскрытия хранить следующим образом:

- Микропланшет со стрипами хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- Конъюгат и раствор ТМБ 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;
- «Буфер Р» после вскрытия флакона хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;

- «Буфер П» и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

- Промывочный буфер, готовый к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C). Не добавлять в емкость с используемым промывочным буфером вновь приготовленный раствор;

13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции. Любые отклонения от рекомендованных процедур проведения анализа и приготовления реагентов могут привести к получению неверных результатов исследования.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**Таблица 1.**

	КП 1	КП 2	КП 3	КП 4	КП 5	КП 6	КС	Образцы
КП 1	100 мкл							
КП 2		100 мкл						
КП 3			100 мкл					
КП 4				100 мкл				
КП 5					100 мкл			
КП 6						100 мкл		
КС							100 мкл	
Образцы								100 мкл
Инкубация 30 минут +37°C, термостатируемый шейкер, 400-650 об/мин Промывка (5 раз) по 300 мкл в каждую лунку								
Конъюгат	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубация 30 минут +37°C, термостатируемый шейкер, 400-650 об/мин Промывка (5 раз) по 300 мкл в каждую лунку								
ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубация в темноте в течение 15-30 минут, КТ								
Стоп-	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Регистрация результатов, фотометр, 450 нм <i>в течение 20 минут после добавления стоп-реактанта</i>								

Примечание к таблице:

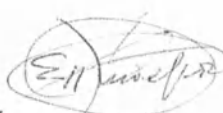
КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

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

По вопросам качества набора обращаться в ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194156, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Энгельса, д. 27, корп. 38, лит. К, пом. 18,19, тел./факс (812)293-23-24 или в НОЦ «Институт лабораторной медицины» ГБОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздравсоцразвития по адресу: 197087, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д.6/8, тел. (812) 233-97-26.

Генеральный директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»


Е.Н. Схолль-Энгбертс.

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики с курсом молекулярной медицины,
директор НОЦ «Институт лабораторной медицины»
ГБОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздравсоцразвития,
Главный специалист-эксперт
по клин. лаб. диагностике Росздравнадзора
по С-ЗФО, д.м.н., профессор

В.Л. Эмануэль.

