

«УТВЕРЖДЕНА»

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора

от « » 20 г. №



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТИРЕОГЛОБУЛИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ТирондИФА-ТГ»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТирондИФА-ТГ» предназначен для количественного определения тиреоглобулина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тиреоглобулин (ТГ) — основной белок щитовидной железы, который является предшественником тиреоидных гормонов: тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) — и формой их хранения. Он представляет собой йодированный гликопротеин с молекулярной массой 660 кДа, состоящий из двух одинаковых субъединиц.

Концентрация ТГ в сыворотке крови зависит от функционального состояния щитовидной железы, её массы, наличия и степени воспаления в ней. У здоровых людей его уровень не превышает 55 нг/мл и может увеличиваться почти вдвое при беременности. После хирургического вмешательства или лечения радиоактивным йодом концентрация ТГ в крови остаётся повышенной в течение нескольких недель. В популяции людей, живущих в условиях дефицита йода, повышен средний уровень ТГ в крови (с 1994 г. ТГ является одним из индикаторов зобной эндемии ВОЗ).

Основной целью определения уровня ТГ является мониторинг больных с дифференцированной тиреоидной карциномой. Динамика концентрации ТГ является маркером для оценки эффективности лечения, выявления возможных рецидивов и появления метастазов у пациентов после полной или частичной тиреоэктомии. Данный показатель не используется для первичной диагностики рака щитовидной железы.

Значение концентрации ТГ в крови может служить для уточнения диагноза при врождённом гипотиреозе. Повышенный уровень ТГ позволяет дифференцировать подострый тиреоидит от медикаментозного тиреотоксикоза, при котором уровень ТГ не повышается. Увеличение концентрации данного белка предвещает рецидив при отмене супрессивной терапии у пациентов с болезнью Грейвса.

Определение содержания ТГ иногда бывает осложнено наличием в анализируемой сыворотке аутоантител к нему. Влияние аутоантител на ход анализа может приводить к ложнозаниженным результатам. Для уточнения результатов анализа необходимо всегда совмещать определение концентрации ТГ с определением аутоантител к нему.

Серийные измерения ТГ в сыворотке крови при мониторинге пациента должны проводиться одним методом. Результаты измерения должны передаваться лечащему врачу с указанием марки набора. При переходе к другому набору в лаборатории должна быть проведена клиническая проверка и сравнение последующего набора с предыдущим.

1.3. Набор «ТироидИФА-ТГ» 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 (всего 96 определений).

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ТироидИФА-ТГ» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ТГ. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ТГ-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ТГ, содержащегося в исследуемом образце, и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ТГ в исследуемом образце (Рисунок 1).

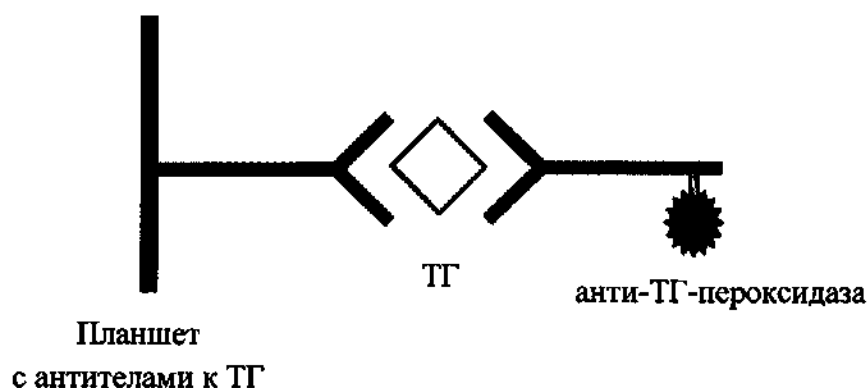


Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ТГ в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ТГ в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ТГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ТГ» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), аттестованные по сертифицированному референсному материалу ТГ BCR CRM 457, содержащие известные количества ТГ. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций ТГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные - 0; 3; 10; 30; 100; 300 нг/мл - 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ТГ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);

- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (3,0 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием ТГ, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител с альфа-фетопroteinом, фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ), тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), дийодтиронином (Т2), трийодтиронином (Т3), тироксином (Т4).

3.2. Коэффициент вариации результатов определения ТГ в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «ТироидИФА-ТГ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ТГ в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТГ — проверка соответствия значения определяемой концентрации ТГ расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ТГ в сыворотке крови человека не превышает 1 нг/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ТироидИФА-ТГ» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ТГ 30 000 нг/мл.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. Содержание ТГ измеряли у 223 здоровых лиц в возрасте 21-45 лет. Измеренная концентрация ТГ не превышала 55 нг/мл в 99,1% случаев.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 1.
- 4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».
- 4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.
- 4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.
- 4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50–500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения (до 3-х месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат анти-ТГ-пероксидаза готов к использованию. Расход конъюгата Е на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.4. Буфер Д готов к использованию.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

В Приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.1.9. Разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если по предварительным данным или по результатам анализа (см. п. 9.3.) значения концентрации ТГ в исследуемых образцах выше КП №6, образцы следует развести буфером Д в 50 раз. Пример подготовки образца к анализу:

490 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.2. Постановка анализа

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

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

7.2.2. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл раствора конъюгата Е.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ со скоростью 500–800 об/мин.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.5., 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.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

Примечание: максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.

7.2.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$).

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.7., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре $+18...25^{\circ}\text{C}$.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед. ОП.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации ТГ (нг/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».

Примечание 2: для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

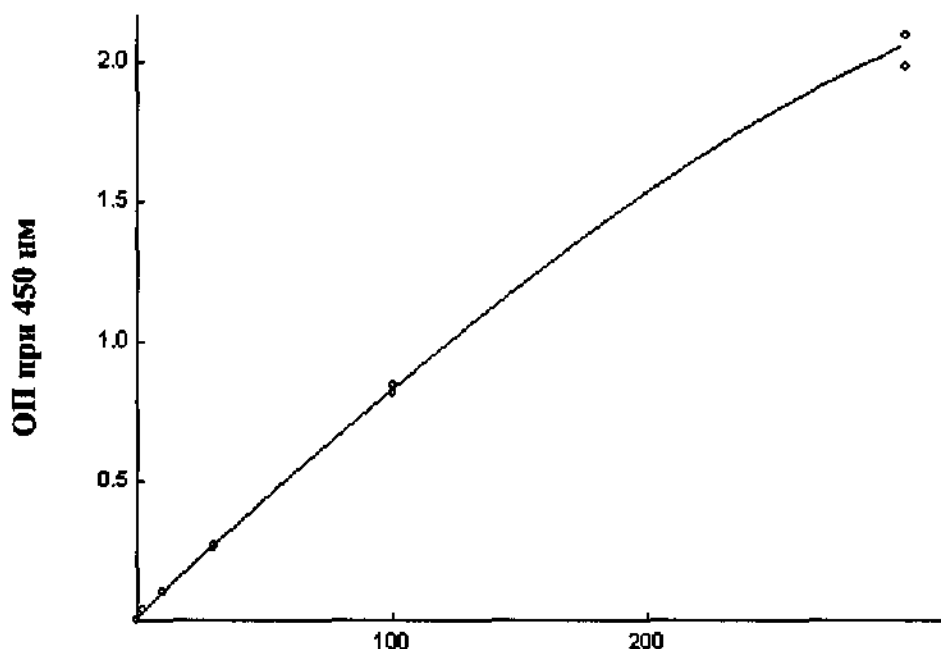
$$B - B_T$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы;

B_T – среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

9.2. Определить содержание ТГ в пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ТГ умножить на фактор разведения.

9.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации ТГ, превышающих номинал КП №6, не допускается. Для точного определения концентрации ТГ в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п. 7.1.9.



Концентрация ТГ, нг/мл
Рисунок 1. Типичный калибровочный график
Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ТироидИФА-ТГ» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- конъюгат Е, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- промыочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

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

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ТГ в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

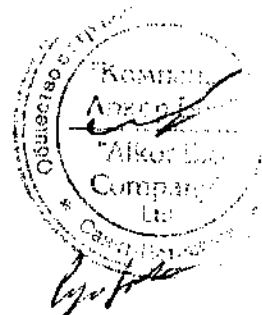
10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ТиреоидИФА-ТГ» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, телефон/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.
«27» января 2010г.

Подпись: *[Signature]*
Удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись: *[Signature]*

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	100 мкл конъюгата анти-ТГ-пероксидаза	КТ +18 ...25°C	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		50 мкл КП и КС			
3		50 мкл исследуемых образцов			
4	Инкубация	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500-800об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор =14 мл буфера Р+266 мл Н ₂ О
6	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15' - 30'	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
9	Перемешивание		КТ	1 - 2'	шейкер
10	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
11	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/соответствующее ПО

Примечания: КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка;

ОП — оптическая плотность; КТ — комнатная температура (+18...25°C); ПО — программное обеспечение.

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 10 (десять) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев