УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от_____200__ г.
№_____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ХЕМА»
_____ Ю. С. Лебедин
10 января 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения тиреоглобулина в сыворотке (плазме) крови

«ТГ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «ТГ-ИФА» предназначен для *ин витро* определения тиреоглобулина в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тиреоглобулин (ТГ) – высокомолекулярный белок с молекулярной массой около 650-700 кДа, вырабатываемый эпителиальными клетками щитовидной железы. В нормальной щитовидной железе ТГ экскретируется в просвет фолликулов и подвергается ферментативному йодированию, в ходе которого высвобождаются предшественники гормонов трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4). Вместе со свободными гормонами незначительные количества ТГ проникают кровоток. Синтез ТГ регулируется гормонами гипофизарно-гипоталамической оси {тиролиберином и тиреотропным гормоном (ТТГ)}, а также самими гормонами щитовидной железы в случае их введения в терапевтических целях. У больных с дифференцированной тиреоидной аденокарциномой серийное определение ТГ в сыворотке служит надежным мониторинговым маркером полноты резекции железы, рецидива и метастатического роста опухоли. Значительное повышение уровня ТГ в сыворотке крови наблюдается также при доброкачественных заболеваниях щитовидной железы: тиреоидитах и гипертиреозах различной этиологии. При этом серийное определение ТГ может использоваться также в мониторинге и прогнозе тиреостатической терапии болезни Грейвса.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение ТГ в сыворотке (плазме) крови в клинической практике используется обычно для клинической лабораторной диагностики патологий щитовидной железы различной этиологии.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение ТГ основано на использовании «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к ТГ человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, во время инкубации одновременно происходит связывание ТГ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляется с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к ТГ с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

пероксидазой.

В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание содержимого лунок. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации ТГ в исследуемом образце. Концентрацию ТГ в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности ($ОП_{450}$) от содержания ТГ в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- **планшет** 96-луночный стрипированный с сорбированными на внутренней поверхности лунок мышиными моноклональными анти-ТГ антителами; готов к использованию - 1 шт.;
- **калибровочные пробы** на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества ТГ - **0; 10; 25; 100 и 400 нг/мл**; концентрации ТГ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (по 1,0 мл каждая); калибровочная проба 0 нг/мл - 6,0 мл;
- **конъюгат**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ТГ; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (1,0 мл);
- **концентрат отмывочного раствора** 21-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);
- **стоп-реагент**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **липкая лента** с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;
- **аналитический паспорт;**
- **Инструкция по применению Набора.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Использование подобранной на испытательной базе ООО «ХЕМА» пары мышиных моноклональных антител к ТГ человека позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «ТГ-ИФА» концентрация ТГ в сыворотке (плазме) крови не превышает 1,0 нг/мл.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания ТГ антител в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «ТГ-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТГ - соответствие измеренной концентрации ТГ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 25 нг/мл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации ТГ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей ТГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 10,0-400 нг/мл и составляет $\pm$ 10,0%.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Нижний предел, нг/мл	Верхний предел, нг/мл
Здоровые доноры	1,0	50

В соответствии с требованиями **GLP** (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «ТГ-ИФА» уточнить значения концентрации ТГ, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности-соблюдение «*Правил 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. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- **фотометр вертикального сканирования**, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- **дозаторы** со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 5,0-250 мкл;
- **термостат**, поддерживающий температуру +37±0,1 ^{0}C;
- **цилиндр мерный** вместимостью 500 мл;
- **вода дистиллированная**;
- **перчатки** резиновые или пластиковые;
- **бумага** фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.
ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18-25 ^{0}C) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}C не более 24 ч или при температуре минус 20 ^{0}C не более 2 недель.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышиные антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов «ТГ-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации ТГ в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 ^{0}C в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрата + 19 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 ^{0}C) не более 2 сут. или при температуре +2-8 ^{0}C не более 10 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Если предполагаемая концентрация ТГ в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови превышает 400 нг/мл, его следует предварительно развести, используя калибровочную пробу 0 нг/мл.

7.2. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.3. Внести во все лунки планшета по 50 мкл конъюгата.

Внесение конъюгата в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.4. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 60 мин при температуре +37 ± 0,1 ^{0}C .

7.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.6. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ).

Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 ^{0}C) в течение 15-25 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.7. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести не позднее 5 мин после внесения стоп-реагента.

В случае невозможности своевременного измерения ОП растворов в лунках на фотометре, планшет допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}C не более 4 ч.

8.2. Если программа фотометра позволяет вычитать величину ОП в лунках с калибровочной пробой 0 нг/мл из значений ОП всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину **B** - среднее арифметическое значение величины ОП в лунках, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыворотку или исследуемые образцы. Если же фотометр не позволяет вычитать величину ОП лунок с калибровочной пробой 0 нг/мл, то необходимо пользоваться формулой $\mathbf{B-B_0}$, где B_0 - среднее арифметическое значение величины ОП в лунках с калибровочной пробой 0 нг/мл.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация ТГ в калибровочных пробах (нг/мл), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб ($ОП_{450}$).

9.2. Определить по калибровочному графику содержание ТГ в исследуемых образцах.

9.3. Если исследуемый образец сыворотки (плазмы) дополнительно разводили (см. п. 7.1.), умножить полученный результат на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «ТГ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 ^{0}C в течение всего срока годности (12 мес.).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 ^{0}С не более 5 сут.

10.2. *Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.*

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;

- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 ^{0}С в течение всего срока годности Набора;

- конъюгат и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) после вскрытия флаконов допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}С не более 1 мес.;

- стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}С в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}С не более 1 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20 ^{0}С в течение всего срока годности Набора;

- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 ^{0}С) не более 2 сут. или при температуре +2-8 ^{0}С не более 10 сут.;

- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}С в течение всего срока годности Набора;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «ТГ-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА» _____ к. б. н. Д. С. Костригин
10 января 2009 г. М.П.

«СОГЛАСОВАНО»
Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздрава _____ д.м.н., профессор В. В. Долгов
М.П.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru