

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Здравоохранения
Республики Беларусь

 В.Е.Шевчук

“ 05 ” 11 2008 г.



ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОГЛОБУЛИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ТироидИФА-ТГ
Комплект 1

СП ООО "Фармлэнд",
Генеральный директор



В.В.Голынников

2007 г.

2008

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для количественного определения концентрации тиреоглобулина в сыворотке крови человека “in vitro” методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 Тиреоглобулин (ТГ) – основной белок щитовидной железы, который является предшественником тироидных 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 тироидной 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.

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения оптической плотности (ОП) раствора ТМБ. Всего – 96 определений при использовании всех стрипов одновременно.

Набор рассчитан на 4 постановки иммуноферментного анализа: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки).

2.2 Набор позволяет определять концентрацию ТГ в сыворотке крови человека в диапазоне от 3 до 300 нг/мл.

2.3 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 комплект
Калибровочная проба С ₀ *	1 флакон; 3,0 мл
Калибровочная проба С ₁ *	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба С ₂ *	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба С ₃ *	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба С ₄ *	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба С ₅ *	1 флакон; 0,5 мл
Контрольная сыворотка	1 флакон; 0,5 мл
Конъюгат анти-ТГ-пероксидаза (Конъюгат Е)	1 флакон; 14 мл
Концентрированный буферный раствор для промывания лунок (Буферный раствор Р)	1 флакон; 14 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ)	1 флакон; 14 мл
Стоп-реагент	1 флакон; 14 мл
Закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки	1 пакет
*Значения концентрации ТГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов.	

2.4 Продолжительность анализа составляет 1 ч 15 мин.

2.5 Принцип работы набора. В наборе «ТиреоидИФА-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 его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ТГ-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ТГ. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ТГ в исследуемом образце.

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

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудова-

нием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.2 Стоп-реагент, представляющий собой 1Н раствор соляной кислоты, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

3.3 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

4 Правила работы с набором

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток хранят при температуре (2-8)°С в течение 48 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20°С). Избегать повторных циклов замораживания-размораживания. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, содержащие азид натрия, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо использовать пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

4.2 При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимен-

та необходимо построение новой калибровочной кривой и рекомендуется определение концентрации ТГ в контрольной сыворотке.

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Фотометр типа «Multiskan» для измерения оптической плотности или аналогичный ему;

- термостатируемый шейкер типа «iEMS Incubator/Shaker», позволяющий производить встряхивание со скоростью (500-800) об/мин при температуре 37 °С или аналогичный ему;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);

- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,005 до 5,0 мл (от 5 до 5000 мкл);

- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 0,3 мл (до 300 мкл);

- мерный цилиндр вместимостью 500 мл;

- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);

- пробирки одноразовые с пробками вместимостью 3 мл;

- штатив для пробирок;

- вата медицинская гигроскопическая;

- бумага фильтровальная;

- перчатки резиновые хирургические;

- раствор с объемной долей этилового спирта 70%;

- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;

- вода дистиллированная;

- контейнер для сбора твердых отходов;

- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25)° С в течение 30 мин.

Все образцы сывороток и реагенты перед проведением анализа тщательно перемешать.

6.2 Подготовка растворов калибровочных проб и контрольной сыворотки

Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Вскрытые флаконы с калибровочными пробами и контрольной сывороткой можно хранить при температуре (2-8)° С не более 1 месяца.

6.3 Подготовка проб исследуемых образцов сыворотки крови человека

Пробирки для разведения исследуемых образцов сыворотки крови человека поместить в штатив и маркировать следующим образом: № 1, № 2 и т.д.

Если значение концентрации ТГ в исследуемых образцах сыворотки крови по предварительным данным превышает 300 нг/мл, образцы следует развести калибровочной пробой C_0 в 50 раз.

Пример – В пробирку, маркированную «№ 1», внести 0,49 мл (490 мкл) калибровочной пробы C_0 и 0,01 мл (10 мкл) исследуемого образца сыворотки крови, перемешать раствор, избегая образования пены.

Внимание! При определении концентрации ТГ результат необходимо умножить на коэффициент разведения (50).

Внимание! Разводить сыворотку крови следует только в день проведения анализа. При повторной постановке тех же образцов сывороток крови человека необходимо делать новое разведение.

6.4 Приготовление буферного раствора для промывания лунок иммуносорбента

В мерный цилиндр вместимостью 500 мл внести содержимое флакона с буферным раствором Р, затем добавить дистиллированной воды до метки 280 мл и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с буферным раствором Р интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимое количество буферного раствора Р в мерный стакан или цилиндр и развести его дистиллированной водой в 20 раз.

Пример – В мерный цилиндр внести 5 мл буферного раствора Р и 95 мл дистиллированной воды, перемешать раствор, избегая образования пены.

Раствор можно хранить закрытым при температуре (2-8) °С не более 5 суток.

Неиспользованный буферный раствор Р можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.5 Подготовка иммуносорбента

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в фирменный пакет с этикеткой, который затем вложить в закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки. Стрипы можно хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

6.6 Подготовка конъюгата Е и раствора ТМБ

Конъюгат Е и раствор ТМБ готовы к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8)° С не более 1 месяца.

6.7 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия флакона раствор можно хранить при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности.

7 Требования к промыванию планшета

7.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них;

- необходимо при каждом промывании все лунки заполнить раствором до краев (0,30-0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок, встряхнуть планшет на шейкере в течение (5-10) с с последующим декантированием;

- при каждом декантировании тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамкой со стрипами в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 Проведение анализа

8.1 Составить протокол маркировки лунок в соответствии с рисунком 1. Лунки маркировать следующим образом:

- A1, A2 — «Т» для раствора ТМБ;
- B1, B2 — для калибровочной пробы C₀;
- C1, C2 — для калибровочной пробы C₁;
- D1, D2 — для калибровочной пробы C₂;
- E1, E2 — для калибровочной пробы C₃;

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Т	Т	№1									
B	C ₀	C ₀	№1									
C	C ₁	C ₁	№2									
D	C ₂	C ₂	№2									
E	C ₃	C ₃	№3									
F	C ₄	C ₄	№3									
G	C ₅	C ₅	№4									
H	КС	КС	№4									

Рисунок 1

- F1, F2 — для калибровочной пробы C₄;
- G1, G2 — для калибровочной пробы C₅;
- H1, H2 — для контрольной сыворотки (КС);
- A3, B3 - — для образцов исследуемых сывороток крови человека №1 -

8.2 Внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 0,1 мл (100 мкл) конъюгата Е.

8.3 Внести в дубликатах в соответствующие лунки по 0,05 мл (50 мкл) калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки — по 0,05 мл (50 мкл) проб исследуемых образцов сывороток крови.

Внимание! Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и проб исследуемых образцов сыворотки крови не должны превышать 15 мин, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам!

8.4 Инкубировать планшет на термостатируемом шейкере при температуре 37° С в течение 1 ч.

8.5 Удалить содержимое лунок с помощью промывателя, затем промыть лунки планшета буферным раствором для промывания лунок иммуносорбента (п 6.3) пять раз.

8.6 Внести немедленно во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) раствора ТМБ и инкубировать планшет в защищенном от света месте при температуре (18-25)° С в течение 15 мин.

8.7 Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реакента. Планшет встряхнуть на шейкере в течение (1-2) мин.

8.8 Не позже чем через 1 мин после остановки реакции, определить ОП в лунках в одноволновом режиме при длине волны 450 нм против воздуха.

В случае невозможности по техническим причинам своевременно измерить ОП растворов в лунках на фотометре, планшет можно хранить при температуре (2-8)° С не более 20 мин.

8.9 Схема анализа приведена в таблице 1.

9 Обработка результатов анализа

9.1 Если программа фотометра позволяет вычитать величину ОП в лунках А1 и А2 из значений ОП всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы образцов сывороток крови, ОЕ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину ОП лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $B - B_T$, где B_T — среднее арифметическое значение ОП лунок А1 и А2, ОЕ; В — среднее значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы образцов сывороток крови, ОЕ.

9.2 Рассчитать величину В, ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыворотку, пробы исследуемых образцов сывороток крови.

9.3 В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости величины В, ОЕ, от концентрации ТГ в калибровочных пробах, нг/мл, откладывая на оси ординат значения ОП, ОЕ, а по оси абсцисс — значения концентраций ТГ, нг/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

9.4 Определить по калибровочному графику концентрацию ТГ в пробах исследуемых образцов сывороток крови, нг/мл.

В случае предварительного разведения исследуемых образцов сывороток крови необходимо измеренную концентрацию ТГ умножить на фактор разведения.

10 Аналитические характеристики набора

10.1 Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител с альфа-фетопротеином, фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ), тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), дийодтиронином (T_2), трийодтиронином (T_3), тироксином (T_4).

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

10.3 Линейность. Зависимость концентрации ТГ в образцах сывороток крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ТГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций (3–300) нг/мл и составляет (90–110) %.

10.4 Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТГ – отношение измеренной к расчетной концентрации ТГ в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы C_2 . Процент открытия составляет (90–110) %.

10.5 Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ТГ в сыворотке крови человека не превышает 1,0 нг/мл.

10.6 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.

10.7 Клиническая проверка. Содержание ТГ измеряли у 158 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Диапазон измеренных концентраций ТГ составил (1,5–63,6) нг/мл.

10.8 Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ТГ, нг/л, соответствующие нормальным.

11 Форма выпуска набора

11.1 Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

1 **комплект 1** – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на **4 постановки ИФА**: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки). Всего – **96 определений**;

2 **комплект 2** – для проведения анализа на автоматическом анализаторе открытого типа. Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на 6 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок). Всего – 96 определений.

12 Условия хранения и применения набора

12.1 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2–8)° С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 5 суток.

Запрещается замораживать компоненты набора.

12.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

12.3 Срок годности набора – 12 месяцев.

Таблица 1 – Схема проведения анализа

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с протоколом маркировки лунок по п 8.1								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-48
Конъюгат Е, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
КП С ₀ , мкл	–	50	–	–	–	–	–	–	–
КП С ₁ , мкл	–	–	50	–	–	–	–	–	–
КП С ₂ , мкл	–	–	–	50	–	–	–	–	–
КП С ₃ , мкл	–	–	–	–	50	–	–	–	–
КП С ₄ , мкл	–	–	–	–	–	50	–	–	–
КП С ₅ , мкл	–	–	–	–	–	–	50	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	50	–
С _х , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
Инкубация №1	37° С, термостатируемый шейкер, 1 ч								
5-кратная промывка: промывочный буферный раствор, мкл	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	(18-25)° С, 15 мин, защищенное от света место								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	(18-25)° С, шейкер, (1-2) мин								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Спектрофотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								
Примечания 1 КП – калибровочная проба; 2 КС – контрольная сыворотка; 3 С _х – анализируемые пробы.									

Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы
- [4] Постановление № 33 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 г.
О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников
- [5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Главным специалистом
СП ООО «Фармлэнд»

Ведущим-технологом

Ведущим специалистом по
диагностическим тест-системам



Ю.В.Сенчук



Е.И.Лаврецкой



И.М.Богдановской

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Здравоохранения
Республики Беларусь


В.Е.Шевчук
"05" 11 2008 г.


ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОГЛОБУЛИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ТирондИФА-ТГ
Комплект 2

СП ООО "Фармлэнд",
Генеральный директор


В.В.Голынников
"12" 11 2007 г.


2008

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для количественного определения концентрации тиреоглобулина в сыворотке крови человека “in vitro” 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 составляет от 2 до 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.

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 комплект
Калибровочная проба С ₀ *	1 флакон; 3,0 мл
Калибровочная проба С ₁ *	2 флакона по 0,5 мл
Калибровочная проба С ₂ *	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба С ₃ *	1 флакон; 0,5 мл
Калибровочная проба С ₄ *	2 флакона по 0,5 мл
Калибровочная проба С ₅ *	1 флакон; 0,5 мл
Контрольная сыворотка	2 флакона по 0,5 мл
Конъюгат анти-ТГ-пероксидаза (Конъюгат Е)	1 флакон; 14 мл
Концентрированный буферный раствор для промывания лунок (Буферный раствор Р)	1 флакон; 14 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ)	2 флакона по 14 мл
Стоп-реагент	1 флакон; 48 мл
Многоцелевые пробирки	100 штук
Концентрированный раствор Триала (Триал)	1 флакон; 50 мл
*Значения концентрации ТГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов.	

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения оптической плотности (ОП) раствора ТМБ. Всего – 96 определений при использовании всех стрипов одновременно.

Набор рассчитан на 6 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок).

2.3 Набор позволяет определять концентрацию ТГ в сыворотке крови человека в диапазоне от 3 до 300 нг/мл.

2.4 Продолжительность анализа составляет 1 ч 15 мин.

2.5 Принцип работы набора. 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 его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ТГ-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ТГ. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ТГ в исследуемом образце.

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

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сывороток (плазмы), которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2];
- в случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.2 Стоп-реагент, содержащий соляную кислоту, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

3.3 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 Все лица, занятые при производстве наборов, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

4 Правила работы с набором

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток хранят при температуре (2-8)° С в течение 48 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20° С). Избегать повторных циклов замораживания-размораживания. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, содержащие азид натрия, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;

4.2 В случае дробного применения набора необходимо извлечь калибровочные пробы и контрольную сыворотку из автоматического анализатора после их вне-

сения в лунки планшета, участвующие в постановке анализа и, плотно закрыв крышками, убрать в холодильник. Не допускается повторное использование калибровочных проб и контрольной сыворотки, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности. Остальные жидкие реагенты убрать в холодильник сразу по окончании сессии. Эти ограничения обусловлены естественным испарением жидкостей, приводящим к получению некорректных результатов измерения при последующем использовании реагентов.

4.3 При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение новой калибровочной кривой и рекомендуется определение концентрации ТГ в контрольной сыворотке.

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Автоматический иммуноферментный анализатор открытого типа «Alisei» или аналогичный ему;

- пипетки одноканальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,02 до 1,0 мл (от 20 до 1000 мкл);
- мерный цилиндр вместимостью 500 мл;
- пробирки одноразовые с пробками вместимостью 3 мл;
- штатив для пробирок;
- вата медицинская гигроскопическая;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70%;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода дистиллированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре (18-25)° С в течение 30 мин.

6.2 Подготовка растворов калибровочных проб и контрольной сыворотки

Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Вскрытые флаконы с калибровочными пробами и контрольной сывороткой можно хранить при температуре (2-8)° С не более 1 месяца.

6.3 Подготовка проб исследуемых образцов сывороток крови человека

Если значение концентрации ТГ в исследуемых образцах сывороток крови по предварительным данным превышает 300 нг/мл, образцы следует развести калибровочной пробой C_0 в 50 раз. Разведение исследуемых образцов сывороток крови производится в соответствии с инструкцией к анализатору «Alisei»

Внимание! Разводить сыворотку крови следует только в день проведения анализа. При повторной постановке тех же образцов сывороток крови человека необходимо делать новое разведение.

6.4 Приготовление буферного раствора для промывания лунок иммуносорбента

В мерный цилиндр вместимостью 500 мл внести содержимое флакона с буферным раствором Р, затем добавить дистиллированной воды до метки 280 мл и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

Раствор можно хранить закрытым при температуре (18-25)° С не более 5 суток.

6.5 Приготовление рабочего раствора Триала для промывания внутренних магистралей и игл автоматического анализатора

В стеклянную колбу вместимостью 6000 мл внести содержимое флакона с раствором Триала, затем добавить 4950 мл дистиллированной водой и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

Раствор можно хранить закрытым при температуре (18-25)° С не более 5 суток.

6.6 Подготовка иммуносорбента

Открыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности.

6.7 Подготовка конъюгата Е и раствора ТМБ

Конъюгат Е и раствор ТМБ готовы к использованию. После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8)° С не более 1 месяца.

6.8 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия флакона раствор можно хранить при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности.

7 Проведение анализа

7.1 Иммуноферментный анализатор «Alisei» имеет полностью автоматизированный процесс проведения анализа: внесение реагентов, промывка, инкубирование, измерение оптической плотности, обработка результатов. Программа определения концентрации ТГ введена в память анализатора.

8 Аналитические характеристики набора

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

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

8.3 Линейность. Зависимость концентрации ТГ в образцах сывороток крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ТГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций (3–300) нг/мл и составляет (90–110) %.

8.4 Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТГ – отношение измеренной к расчетной концентрации ТГ в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы С₂. Процент открытия составляет (90–110) %.

8.5 Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ТГ в сыворотке крови человека не превышает 1,0 нг/мл.

8.6 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.

8.7 Клиническая проверка. Содержание ТГ измеряли у 223 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Измеренная концентрация ТГ не превышала 55 нг/мл в 99,1 % случаев.

8.8 Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ТГ, нг/л, соответствующие нормальным.

9 Форма выпуска набора

9.1 Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

1 комплект 1 – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на 4 постановки ИФА: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки). Всего – 96 определений;

2 комплект 2 – для проведения анализа на автоматическом анализаторе открытого типа. Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на 6 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок). Всего – 96 определений.

10 Условия хранения и применения набора

10.1 Хранение набора должно производиться в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 5 суток.

Запрещается замораживать компоненты набора.

10.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.3 Срок годности набора – 12 месяцев.

Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы
- [4] Постановление № 33 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 08.08.2000 г.
О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников
- [5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 Правила обращения с медицинскими отходами

Инструкция составлена
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Главным специалистом
СП ООО «Фармлэнд»

Ведущим-технологом

Ведущим специалистом по
диагностическим тест-системам



Ю.В.Сенчук



Е.И.Лаврецкой



И.М.Богдановской