УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от_____2010 г.

№_____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ХЕМА»
_____ О. С. Лебедин
11 января 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения аутоантител к тиреоглобулину в сыворотке (плазме) крови

«АТ-ТГ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «АТ-ТГ-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации аутоантител к тиреоглобулину в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Антитела к тиреоглобулину (АТГ) — это циркулирующие иммуноглобулины против различных эпитопов молекулы тиреоглобулина (ТГ) человека. Присутствие антител к ТГ в сыворотке связано с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы, в том числе с болезнью Грейвса и тиреоидитомХашимото, и с дифференцированным раком щитовидной железы. Эти антитела преимущественно принадлежат классу lgG и являются гетерогенными: из около 40 потенциальных антигенных участков на молекуле ТГ, только 4-6 распознаются антителами, циркулирующими в сыворотке при аутоиммунных заболеваниях. Определение уровня антител к ТГ в сыворотке крови можно использовать как диагностический критерий при определении риска перерождения при дифференцированном раке щитовидной железы. При аутоиммунных заболеваниях ЩЖ АТГ желательно определять вместе с антителами к тиреопероксидазе. АТГ и/или АТПО определяются в высоких концентрациях при болезни Грейвса, тиреоидитеХашимото и его разновидностях: ювенильном лимфоцитарномтиреоидите, хроническом фиброзном варианте тиреоидита, идиопатической миксидеме, атрофическом асимоптоматичекомтиреоидите и синдроме Шмита. Поскольку у пациентов в зависимости от этапа заболевании может наблюдаться гипо-, гипер- или эутиреоидная стадия, определение данных антител является более точным диагностическим признаком при постановке диагноза аутоиммунного поражения ГИЖ и определения степени поражения, чем проведение классических гормональных тестов. Постановка данных особенно важна при диагностике следующих состояний:

- при клинических проявлениях болезни Грейвса без признаков экзофтальма и увеличения ЩЖ; - определение причин гипотиреоза у взрослых с или без изменения размеров ЩЖ.

Достаточно часто встречается увеличение уровня АТГ и АТПО, но нельзя забывать, что появление данных антител не связано между собой, и у одних пациентов может встречаться повышение только уровня АТГ, а у других - только уровня АТПО. Определение уровня АТГ и/или АТПО при определении эффективности лечения и нормализации функций ЩЖ наиболее результативно совместно с определением уровня Т3, Т4 и ТТГ. Однако при лечении тиреоидитаХашимото признаком результативности является понижение уровня АТГ (АТПО понижается намного быстрее) при болезни Грейвса титр антител падает

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

после субтотальной тиреоидэктомии или антитиреоидидной терапии, но слегка увеличивается при использовании йода- 131. Низкие концентрации АТГ наблюдаются у здоровых людей, особенно у женщин.

1.3. Диагностическая значимость определения.

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

1.4. Область применения — клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение аутоантител к тиреоглобулину основано на использовании «сэндвич» варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизован антиген — Thyroglobulin. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиный моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.

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 специфических аутоантител к тиреоглобулину. Концентрацию аутоантител к тиреоглобулину в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности (ОП450) от содержания аутоантител к тиреоглобулину в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный с сорбированными на внутренней поверхности лунок мышиными моноклональными антителами; готов к использованию - 1 шт.;

калибровочные пробы на основе фосфатного буфера (pH7.2-7.4), содержащие известные количества аутоантител к тиреоглобулину — 0; 100; 300; 1000; 3000 МЕ/мл; концентрации АТ-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 1,1мл каждая);

конъюгат; готов к использованию - 1 флакон (1 4 мл);

ИФА-Буфер ; готов к использованию - флакон (50 мл);

раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ); готов к использованию - 1 флакон (1 4 мл);

контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием АТ-ТГ; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (1,1 мл);

концентрат отмывочного раствора 26х-кратный - 1 флакон (22 мл);

стоп-реагент; готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

липкая лента с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;

КОПИЯ ВЕРНА

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

Инструкция по применению Набора реагентов «АТ-ТГ-ИФА»

Паспорт качества Набора реагентов « АТ-ТГ-ИФА»

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность Использование высокоочищенного препарата Thyroglobulin позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором «АТ-ТГ ИФА» концентрация АТ-ТГ в сыворотке (плазме) крови не превышает 5.0 МЕ/мл.

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

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» соответствие измеренной концентрации аутоантител к тиреоглобулину предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 300 МЕ/мл

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации аутоантител к тиреоглобулину в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей АТ-ТГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 100-3000 МЕ/мл и составляет - 10,0%.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Единицы МЕ/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Мужчины	-	100
Женщины	-	100
старше 50 лет	-	150

В соответствии с требованиями GLP (GoodLaboratoryPractice, Хорошая ЛабораторнаяПрактика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «АТ-ТГ-ИФА» уточнить значения концентрации АТ-ТГ, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 1 (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.).

КОПИЯ ВЕРНА

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

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 25-250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 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 °с) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 °с не более 24 ч или при температуре минус 20 °с 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.

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 «АТ-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 АТ-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 °с 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 количествоконцентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

КОПИЯ ВЕРНА

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

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 °с) не более 2 сут, или при температуре +2-8 °с не более 10сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Разбавьте образцы сыворотки (плазмы) крови в 101 раз, используя ИФА-Буфер.

7.2. Если предполагаемая концентрация АТ-ТГ в исследуемом образце превышает 3000 МЕ/мл, его следует дополнительно развести, используя, ИФА-Буфер. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может искажать результаты определения!

7.3. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 100 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов 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 30 мин при температуре комнатной (+18-25 °с).

7.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 3 раза путем 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 мклконъюгата.

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

7.7. Заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 мин при температуре +18-25 °с .

7.8. По окончании инкубации удалите содержимое лунок и омойте лунки 5 раз.

7.9. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 С) в течение 10-20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.10. 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.

КОПИЯ ВЕРНА

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

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 в течение 15 мин после внесения стоп-реагента.

Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1 ,

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация аутоантител к тиреоглобулину в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат оптическая плотность калибровочных проб (ОП450). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание АТ-ТГ в исследуемых образцах. Если используемый образец предразводили, умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «АТ-ТГ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятияизготовителя при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности (18 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °с не более 15 сут.

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

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

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

- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона следует хранить при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) следует хранить при температуре +2-8 °С не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20 °с в течение всего срока годности Набора;

- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 °с) не более 15 сут. или при температуре +2-8 °с не более 45 сут.,

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

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

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

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «АТ-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. Кострикин
11 января 2010 г.

М.П.

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

М.П.

Подпись В.В. Долгова
удостоверяю: специалист по кадровой работе ГОУ ДПО РМАПО Росздрава
подпись

КОПИЯ ВЕРНА

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