

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор

АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»



А.Г. Плехов

2023 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(ТТГ-Имаксиз (IMAXYZ))**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТТГ-Имаксиз (IMAXYZ)» предназначен для количественного *in vitro* определения концентрации тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови человека.

1.2. ТТГ — гликопротеид с молекулярной массой около 30 000 Да, состоящий из двух субъединиц — альфа и бета, секретируемый тиреотропными клетками передней доли гипофиза.

Основной функцией ТТГ является регуляция высвобождения главных гормонов щитовидной железы и управление их синтезом. При падении уровня гормонов щитовидной железы в крови ниже нормального гипофиз секретирует ТТГ, что, в свою очередь, воздействует на щитовидную железу, заставляя её продуцировать и высвобождать больше гормонов. Если же уровень гормонов щитовидной железы в крови превышает нормальный, гипофиз отвечает снижением высвобождения ТТГ, что приводит к снижению синтеза и высвобождения гормонов щитовидной железой. Измерение базовой концентрации ТТГ в сыворотке является важным диагностическим тестом при подозрении на гипотиреоз. Повышенная концентрация ТТГ подтверждает первичный гипотиреоз, тогда как

нормальная или пониженная концентрация исключает его или, реже, указывает на дисфункцию гипофиза или гипоталамуса как причину гипотиреоза. Измерение ТТГ является важным элементом мониторинга терапии дисфункции щитовидной железы. Кроме того, измерение ТТГ после введения экзогенного тиротропин-стимулирующего гормона может применяться для дифференциации вторичного (гипофизарного) гипотиреоза от третичного (гипоталамического).

1.3. Набор «ТТГ-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

В наборе «ТТГ-Имаксиз (IMAXYZ)» использована технология количественного «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта на внутренней поверхности лунок микропланшетов иммобилизованы моноклональные антитела к ТТГ. Другие моноклональные антитела к ТТГ конъюгированы с пероксидазой. Во время инкубации происходит связывание ТТГ, содержащегося в образцах, контрольных материалах и калибровочных пробах с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок и взаимодействие связавшегося ТТГ с моноклональными антителами, мечеными пероксидазой. Оба моноклональных антитела имеют разную эпитопную специфичность к β -субъединице ТТГ, что позволяет использовать их для реализации одностадийного высокоспецифичного анализа.

По окончании инкубации во время промывки происходит удаление всех несвязавшихся компонентов из зоны реакции.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими ТТГ. Степень

окраски прямо пропорциональна концентрации ТТГ в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольных материалах.

После остановки реакции стоп-реагентом (цвет раствора меняется с синего на желтый) и измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках проводится расчет концентрации ТТГ 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 иммобилизованными мышиными моноклональными антителами к ТТГ, маркирован «Микропланшет с моноклональными антителами к ТТГ».

КОНЪЮГАТ

1 флакон, 14 мл

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

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП)

комплект

Аттестованы по Третьему Международному стандарту IRP 81/565, содержат известные количества ТТГ.

КП№1- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 0 мкМЕ/мл ТТГ, маркирован «Калибровочная проба №1».

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 1,0 мкМЕ/мл ТТГ, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 5,0 мкМЕ/мл ТТГ, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 10 мкМЕ/мл ТТГ, маркирован «Калибровочная проба №4».

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 25 мкМЕ/мл ТТГ, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 50 мкМЕ/мл ТТГ, маркирован «Калибровочная проба №6».

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

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС)

1 флакон, 0,5 мл

Маркирован «Контрольная сыворотка», содержит известное количество ТТГ, диапазон концентраций указан на этикетке флакона.

Буфер для разведения

1 флакон, 3,0 мл

образцов сыворотки крови,

Водно-солевой раствор, маркирован «Буфер Р»

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.

1 флакон, 20 мл

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

Дополнительно в состав набора могут входить:

- калибровочная проба №7. Точный номинал калибровочной пробы №7 указан на этикетке флакона;
- контрольная сыворотка №2. Диапазон концентраций указан на этикетке флакона;
- 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 ТТГ в сыворотке крови человека не превышает 0,02 мкМЕ/мл.

4.2. Специфичность. Перекрестной реакции моноклональных антител к β -субъединице ТТГ с хорионическим гонадотропином, фолликулостимулирующим и лютеинизирующим гормонами не обнаружено.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ТТГ в образцах сыворотки крови при разведении «Буфером Р», имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90-110%.

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

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

4.6. Клиническая проверка. Содержание ТТГ измеряли в сыворотках крови, взятых с 9 до 11 часов у 200 здоровых людей в возрасте 21–46 лет. Измеренный диапазон концентраций составил от 0,3 до 4,0 мкМЕ/мл. При использовании набора рекомендуется уточнить значения концентраций ТТГ, соответствующие нормальным, с учетом особенностей популяции.

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.
- 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 500 - 800 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 азида 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. Если значения ТТГ в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения концентрации калибровочной пробы № 6, образцы следует развести Буфером для разведения образцов сыворотки крови в 20 раз:

- 190 мкл Буфера Р + 10 мкл исследуемого образца. Тщательно перемешать.

8.3. Микропланшет. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) 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 П 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 анти-ТТГ-пероксидаза 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. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата анти-ТТГ-пероксидаза.

9.3. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах. *Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут во избежание получения неправильных результатов исследования.*

9.4. Инкубировать стрипы при встряхивании **в течение 1 часа** в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

9.5. 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.

9.6. 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.

9.7. Остановить ферментную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента. Цвет реакционной смеси в лунках должен измениться с синего на желтый. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 минут.

Схема проведения анализа приведена на **Рисунке 2**.

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 А1 и А2 (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 не превышает 0,1 ед.ОП.

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

11.3. При наличии автоматической программы расчета на фотометре в качестве метода аппроксимации калибровочной кривой выбрать метод 4PL, 5PL или кубический сплайн.

11.4. Определить содержание ТТГ в исследуемых образцах и контрольной сыворотке по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ТТГ умножить на фактор разведения.

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

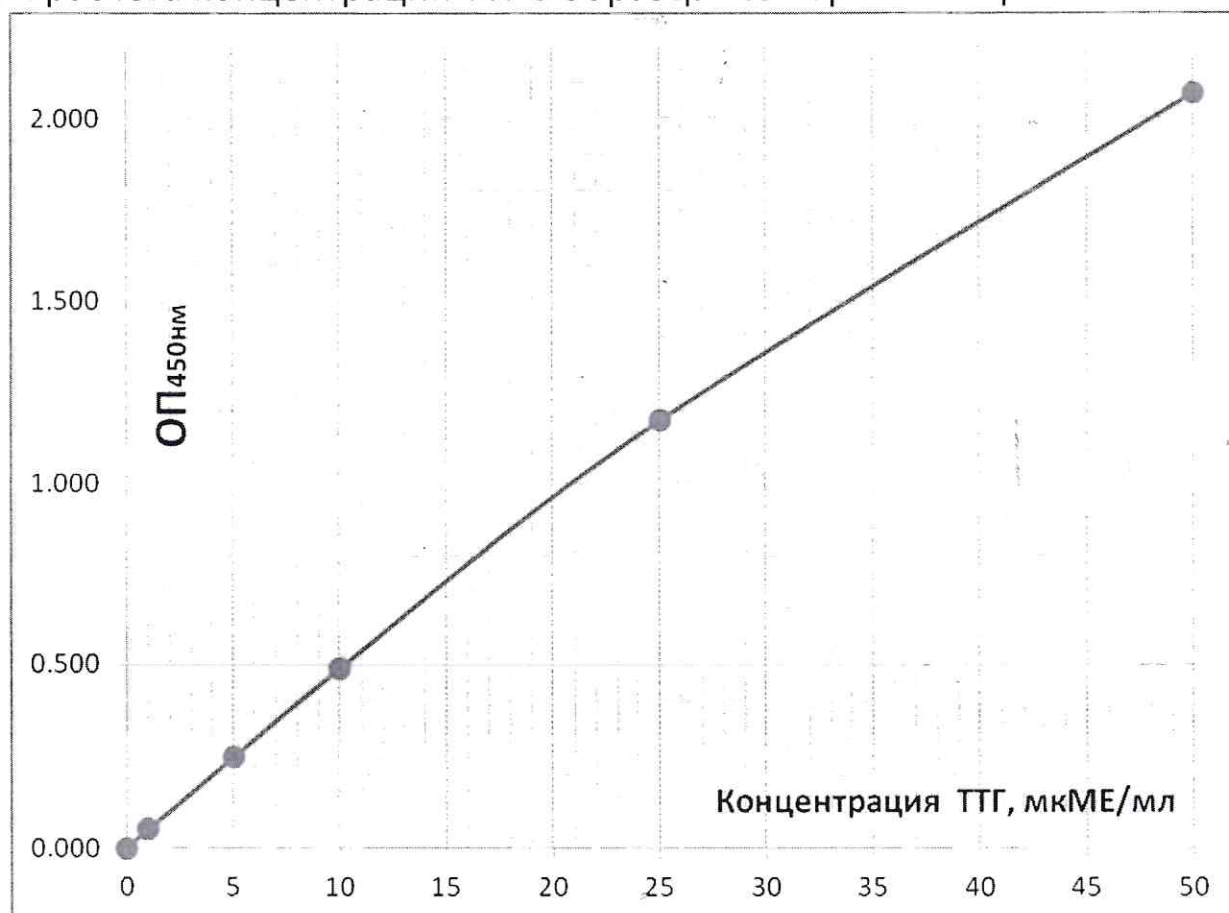


Рисунок 1. Типичный график зависимости оптической плотности от концентрации ТТГ.

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. При интерпретации результатов исследования следует помнить, что:

- Общая концентрация ТТГ в сыворотке крови может зависеть от множества факторов, таких как функционирование щитовидной железы, гипоталамуса, чувствительности гипофиза к тиреотропин-релизинг гормону (ТРГ). В связи с этим одно только определение ТТГ не достаточно для оценки клинического статуса пациента.
- Повышение уровня ТТГ может быть вызвано приемом лекарственных препаратов, таких как домперидон, амидазон, йод, фенобарбитал, фенитоин и др.
- Пониженные концентрации ТТГ отмечались при приеме пропранолола, метимазола, допамина и D-тироксина.
- Генетические вариации структуры ТТГ, а также распад исходной молекулы на фрагменты может влиять на распознавание молекулы ТТГ иммобилизованными антителами и, следовательно, на конечный результат анализа.

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 — 18 месяцев. Не допускается использование серии набора по истечении срока ее годности.

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 2 месяцев при температуре +2...8°C;
- Калибровочные пробы, буфер для разведения образцов сыворотки крови и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 2 месяцев 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.

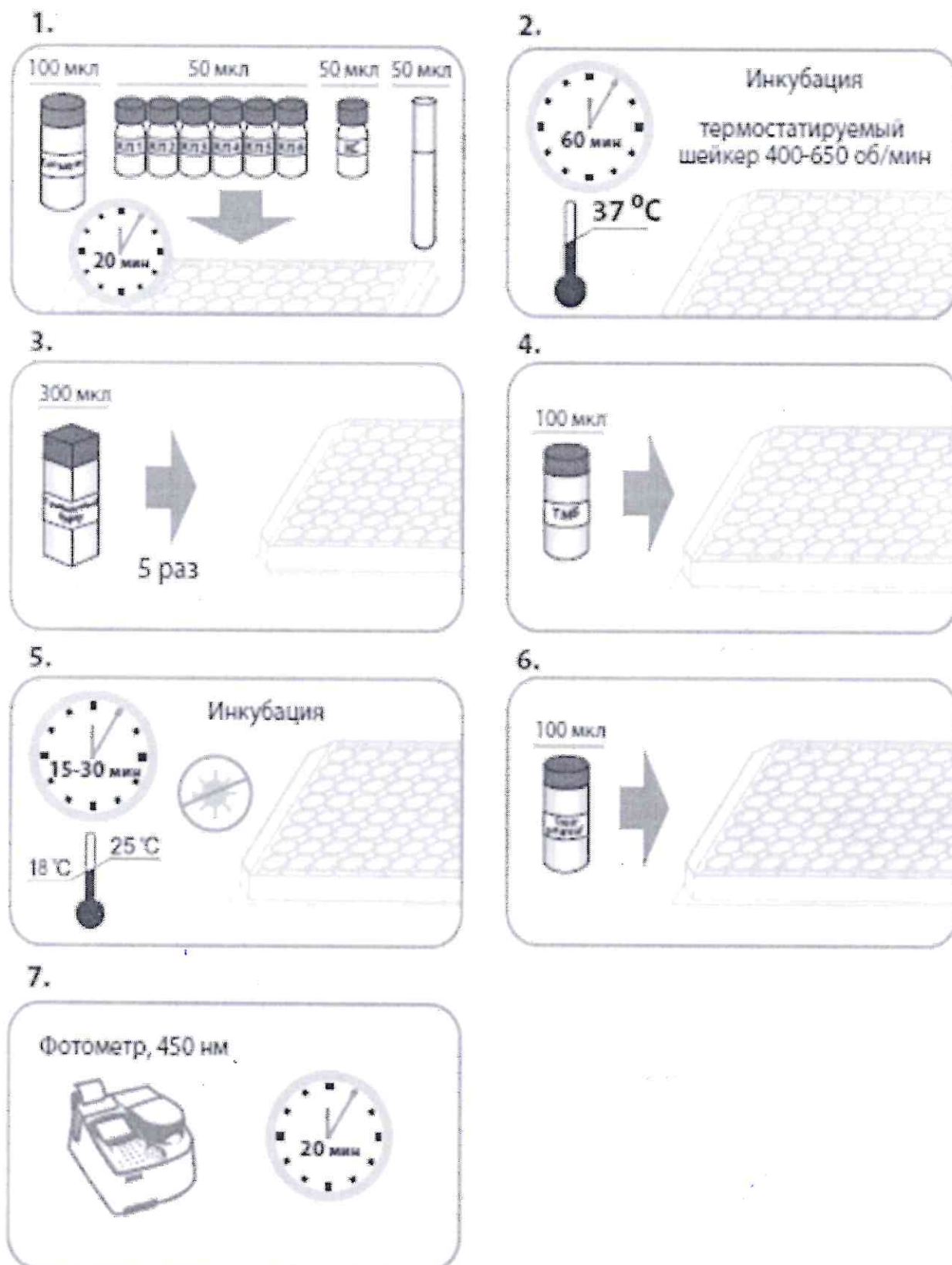
13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции. Любые отклонения от рекомендованных процедур проведения анализа и приготовления реагентов могут привести к получению неверных результатов исследования.

14. СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

14.1. Согласно классификации по СанПиН 2.1.7.2790-10 компоненты набора могут быть отнесены к классу «Г». Утилизация использованных реагентов и реагентов с истекшим сроком годности производить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 в отношении отходов класса «Г».

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Рисунок 2.



По вопросам качества набора обращаться в АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194356, Санкт-Петербург, Дорога в Каменку, д. 56, лит. А тел./факс (812) 250-55-10, 8(800) 200-23-24 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
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»



А.Г. Плехов