«**УТВЕРЖДАЮ**"
Генеральный Директор
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»



_____А.Г. Плехов
«__»_____2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **ТИРЕОГЛОБУЛИНА** В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА **(ТГ-Имаксиз (IMAXYZ))**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. ТГ — иодированный гликопротеин с молекулярной массой около 660 кДа, который вырабатывается фолликулами щитовидной железы (ЩЖ) и является непосредственным предшественником тиреоидных гормонов – тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). Углеводная и белковая части ТГ синтезируются в рибосомах клеток тиреоидного эпителия. ТГ содержит примерно 110 остатков тирозина, последующее йодирование которого приводит к образованию T_4 и T_3, которые освобождаются в кровь в результате отщепления от ТГ под действием протеолитических ферментов ЩЖ. Уровни ТГ в сыворотке относительно высоки при беременности в третьем триместре, в пуповинной крови у новорожденных, и уменьшаются в течение первых двух лет жизни. Повышение уровня ТГ в сыворотке крови выявляется при различных формах тиреотоксикоза: Болезни Грейвса (БГ), подостром и аутоиммунном тиреоидите, многоузловом токсическом и нетоксическом зобе, эндемическом зобе, раке ЩЖ и его метастазах.

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

1.3. При тиреоидитах концентрация ТГ в сыворотке крови может не соответствовать степени клинических симптомов тиреотоксикоза. Дефицит синтеза ТГ наблюдается у детей с врождённым гипотиреоидизмом.

Определение уровня ТГ очень важно для мониторинга лечения дифференцированного рака ЩЖ – его содержание при рецидиве и метастазировании повышается. После тотальной тироидэктомии содержание ТГ в сыворотке крови резко снижено и составляет менее 5 нг/мл. Повышение в послеоперационном периоде уровня ТГ в сыворотке >10 нг/мл указывает на рецидив или появление метастазов рака ЩЖ.

Следует также отметить, что наличие антител к тиреоглобулину (атТГ) может приводить к получению неверных результатов при определении у таких пациентов уровня ТГ и оценке эффективности проводимой терапии.

Мониторинг уровня ТГ должен проводиться с использованием одной и той же методики определения уровня ТГ в сыворотке крови на протяжении всего периода наблюдения. При переходе на другую методику или другого производителя наборов в лаборатории должна быть проведена клиническая проверка и сравнение нового набора с предыдущим. Замену метода определения уровня ТГ в лаборатории следует обсуждать с клиницистом; не следует делать этого без предупреждения.

1.4. Набор «ТГ-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 «ТГ-Имаксиз (IMAXYZ)» использована технология количественного «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта на внутренней поверхности лунок микропланшетов иммобилизованы моноклональные антитела к ТГ. Другие моноклональные антитела к ТГ

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

конъюгированы с пероксидазой. Во время инкубации происходит связывание ТГ, содержащегося в образцах, контрольных материалах и калибровочных пробах с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок и взаимодействие связавшегося ТГ с моноклональными антителами, меченными пероксидазой хрена. Оба моноклональных антитела имеют разную эпитопную специфичность к ТГ, 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, содержавшими ТГ. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ТГ 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 ТГ 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 ТГ, маркирован «Микропланшет с моноклональными антителами к ТГ».

КОНЪЮГАТ **1 флакон, 14 мл**

Конъюгат моноклональных антител к ТГ с пероксидазой, маркирован «Конъюгат».

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП) **комплект**

Аттестованы по Европейскому референс-стандарту CRM 457, содержат известные количества ТГ.

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

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

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 3,0 нг/мл ТГ, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 10 нг/мл ТГ, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 30 нг/мл ТГ, маркирован «Калибровочная проба №4».

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 100 нг/мл ТГ, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 300 нг/мл ТГ, 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 ТГ, 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:

- 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 ТГ в сыворотке крови человека не превышает 0,5 нг/мл.

4.2. Специфичность. Перекрестной реакции обоих моноклональных антител к ТГ с альфафетопротеином (АФП), фолликулостимулирующим

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

гормоном (ФСГ), тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), дийодтиронином (T_2), трийодтиронином (T_3), тироксином (T_4) не обнаружено.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ТГ 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 ТГ в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3, составляет 90–110%.

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

4.6. Клиническая проверка. Концентрация ТГ была измерена в сыворотках крови 200 здоровых людей в возрасте 21-45 лет. Полученные значения концентрации ТГ не превысили 70 нг/мл в 99% случаев. При использовании набора рекомендуется уточнить значения концентраций ТГ, 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

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

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 инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при 121°С, 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 инактивированы 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°С со скоростью 400 - 650 об/мин.
- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.
- Фильтровальная бумага.
- Цилиндр мерный на 200 мл.

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

- 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, гемолизованной, 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°С. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре ниже -20°С. 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°С).

8.2. Предварительное разведение исследуемых образцов. Если значения ТГ в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения концентрации калибровочной пробы № 6, образцы следует развести Буфером Р 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°С) 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°С в течение всего срока годности.

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

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°С) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным 20-кратный «Буфер П» хранить закрытым при температуре +2...8°С в течение всего срока годности

8.6. Конъюгат анти-ТГ-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 А1 и А2, внести по 100 мкл конъюгата анти-ТГ-пероксидаза.

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

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°С со скоростью 400 – 650 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°С) 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 в **Таблице 1**.

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.

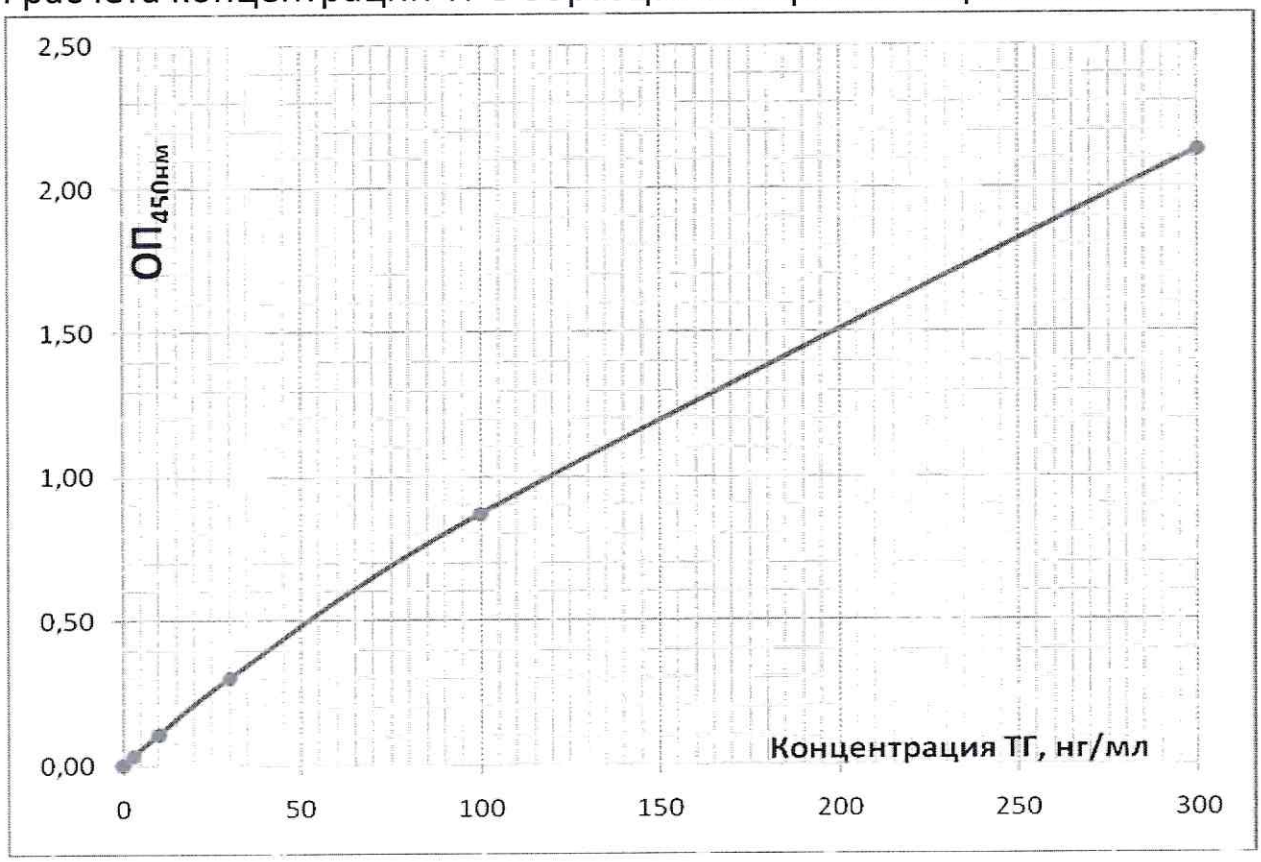
11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках А1 и А2 не превышает 0,1 ед.ОП.

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

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

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

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



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.

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

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°С.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

13.1. Набор должен храниться и транспортироваться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

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°С в течение всего срока годности;
- Конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°С;
- Калибровочные пробы, буфер для разведения образцов сыворотки крови и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°С;
- «Буфер П» и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С в течение всего срока годности.
- Промывочный буфер, готовый к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°С). 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.

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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА **Таблица 1.**

	КП 1	КП 2	КП 3	КП 4	КП 5	КП 6	КС	Образцы
Конъюгат	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
КП 1	50 мкл							
КП 2		50 мкл						
КП 3			50 мкл					
КП 4				50 мкл				
КП 5					50 мкл			
КП 6						50 мкл		
КС							50 мкл	
Образцы								50 мкл
Инкубация 1 час, +37°С, термостатируемый шейкер, 400-650 об/мин								
Промывка (5 раз) по 300 мкл в каждую лунку								
ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубация в темноте в течение 15-30 минут, КТ								
Стоп-реагент	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Регистрация результатов, фотометр, 450 нм *в течение 20 минут после добавления стоп-реагента*								

***Примечание к таблице*:**

КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

КТ — комнатная температура (+18...25°С).

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

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