

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

(ТироидИФА-ТГ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ТироидИФА-ТГ предназначен для количественного определения содержания тиреоглобулина в сыворотке крови человека 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 660кДа, 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 55нг/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 зубной 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.

1.3. Набор ТироидИФА-ТГ рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40неизвестных, бкалибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

Примечание: В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. 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. СОСТАВ НАБОРА:

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ТГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ТГ» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по сертифицированному референсному материалу ТГ CRM 457, содержащие известные количества ТГ; концентрации ТГ указаны на этикетках флаконов; калибровочная проба №1 (0 нг/мл) — 1 флакон (3,0 мл) и калибровочные пробы №2–№6 — 5 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ТГ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «БуферР» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «стоп-реагент» (1Н соляная кислота) — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ТГ, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител альфа-фетопротейном, фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ), тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), диодтиронином (T_2), трийодтиронином (T_3), тироксином (T_4).

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

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ТГ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ТГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2–№ 6 и составляет $\pm 10\%$.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТГ — соответствие измеренной концентрации ТГ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110%.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ТГ в сыворотке крови человека не превышает 1,5 нг/мл.

4.6. 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 30000 нг/мл.

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

4.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ТГ, соответствующие нормальным.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

· Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;

· прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;

· пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;

· пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

· цилиндр мерный, позволяющий отмерять 200 мл;

· стакан стеклянный вместимостью 300 мл;

· вода дистиллированная;

· бумага фильтровальная;

· перчатки резиновые или пластиковые.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

7.2. Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если значения концентрации ТГ в исследуемых образцах по предварительным данным выше 300нг/мл, образцы следует развести калибровочной пробой №1 в 50 раз:

490мкл калибровочной пробы №1 + 10мкл исследуемого образца.

При разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.3. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение времени не менее 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.4. Промывочныйбуфер. Необходимое количество БуфераР развести дистиллированной водой в 10раз.

Например:

5мл БуфераР + 45мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5суток. Оставшийся неиспользованным БуферР хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.5. Конъюгат анти-ТГ-пероксидаза готов к использованию.

7.6. Раствор ТМБ готов к использованию.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Все реагенты должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На последней странице приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — № 2 для калибровочной пробы № 1;

C1, C2 — № 3 для калибровочной пробы № 2;

D1, D2 — № 4 для калибровочной пробы № 3;

E1, E2 — № 5 для калибровочной пробы № 4;

F1, F2 — № 6 для калибровочной пробы № 5;

G1, G2 — № 7 для калибровочной пробы № 6;

H1, H2 — № 8 для контрольной сыворотки.

8.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100мкл раствора конъюгата анти-ТГ-пероксидаза.

8.4. Внести в соответствующие лунки по 50мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

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

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.4, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.7. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минут.

8.9. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину V — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить калибровочный график зависимости V (ед.опт.плотн.) от концентрации ТГ в калибровочных пробах (нг/мл).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $V - V_T$, где V_T — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

Определить содержание ТГ в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ТГ умножить на фактор разведения.

8.10. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более **20 минут** при температуре +2...8°C

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Набор ТиреоидИФА-ТГ должен храниться 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 — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат анти-ТГ-пероксидаза и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C);
- БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

9.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

9.3. Пробы сыворотки крови можно хранить при температуре +2...8°C не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения — при температуре –20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ТГ в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора ТироидИФА-ТГ следует обращаться по адресу: г. Санкт-Петербург, пос. Песочный-2, ул. Ленинградская, д.70/4, тел/факс: (812) 596-67-80.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
Конъюгат анти-ТГ-пероксидаза, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
КП № 1, мкл	–	50	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	50	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	50	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	50	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	50	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	50	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	50	–
С _х , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	50
Инкубация №1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5x	5x	5x	5x	5x	5x	5x	5x	5x
Раствор ТМБ, мкл	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Инкубация №2	КТ, темное место, 15-30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания:

- КП — калибровочная проба;
- КС — контрольная сыворотка;
- С_х — анализируемые пробы;
- ОП — оптическая плотность;
- КТ — комнатная температура (+18...25°C).

Инструкция разработана:

зав.лабораторией биотехнологии ЗАО «Алкор Био» В.А.Головаченко, генеральным директором ЗАО «Алкор Био», к.б.н. Д.Г.Полынцевым и ст.н.сотрудником НИИАГ им. Д.О. Отта РАМН, к.м.н. Н.Н. Ткаченко.

