

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г.

№ _____

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора

**ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»**

О.Н. Шлюндин

«20» апреля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-Тироксид-Тиреоглобулин»**

**Тест-система иммуноферментная для количественного определения
тиреоглобулина**

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-Тироксид-Тиреоглобулин» предназначен для количественного определения содержания тиреоглобулина (ТГ) в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Тиреоглобулин – большой йодированный, гликозилированный белок с молекулярной массой 660 кДа, продуцируется клетками щитовидной железы. На его поверхности происходит синтез гормонов трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4). Тиреоглобулин – форма хранения тиреоидных гормонов во внеклеточном коллоиде щитовидной железы. У 75% здоровых людей часть ТГ из щитовидной железы поступает в кровь. У населения регионов, испытывающих дефицит йода, средний уровень ТГ повышен. В связи с этим с 1994 года данный показатель используется как один из индикаторов зубной эндемии. Высокая концентрация ТГ в сыворотке крови определяется при многих заболеваниях щитовидной железы: гипертиреоз, тиреоидит, дифференцированная карцинома щитовидной железы.

Оценка уровня ТГ служит основным критерием ведения и пожизненного наблюдения больных, оперированных по поводу рака щитовидной железы. После проведения тиреоидэктомии происходит быстрое снижение содержания ТГ. Последующее нарастание концентрации этого маркера в сыворотке крови свидетельствует о рецидиве заболевания. Тестирование на ТГ необходимо также для правильной диагностики и лечения гипотиреоза новорожденных.

В некоторых образцах сывороток присутствуют циркулирующие антитела к ТГ. Наличие аутоантител приводит к ложноотрицательным результатам при определении ТГ. Поэтому параллельно с оценкой содержания ТГ образцы сывороток необходимо тестировать на наличие антител к нему.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора при одновременном использовании всех стрипов планшета (всего 96 определений).

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех стандартных калибровочных проб.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

В наборе «ДС-ИФА-Тироксид-Тиреоглобулин» применен «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА. Для реализации его использованы два моноклональных антитела с разной специфичностью к двум доменам молекулы тиреоглобулина: первые антитела иммобилизованы на твердой фазе, вторые (меченные пероксидазой хрена) входят в состав конъюгата. 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. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству тиреоглобулина в исследуемом образце.

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации связанного конъюгата анти-ТГ-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ТГ в исследуемых пробах.

2.2. Состав набора реагентов «ДС-ИФА-Тироксид-Тиреоглобулин»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ТГ.	1 шт.
Конъюгат - моноклональные антитела к ТГ человека, меченные пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 – стандартные калибровочные пробы, аттестованные по сертифицированному референсному материалу ТГ CRM 457 BCR (Брюссель), содержащие известное количество ТГ. Прозрачные или слегка опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости. Значения концентраций ТГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержат: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат, 0,1% фенол.	6 флаконов по 0,5 мл (Калибратор 0 – 2,0 мл)
Контрольная сыворотка - сыворотка с известным содержанием ТГ. Прозрачная или слегка опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость. Значение концентрации ТГ в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат, 0,1% фенол.	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат x 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор - прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент/0,2М - серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
Бланк для построения калибровочной кривой	1 шт.
Инструкция по применению	1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов;
- одноразовые наконечники;

- пластиковые ванночки для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или полиэтиленовый пакет с замком.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая концентрация тиреоглобулина в сыворотке крови составляет 1,5 нг/мл.

3.2. Специфичность. Для определения кросс-реактивности в образец сыворотки с известной концентрацией ТГ добавляли кросс-реагенты, указанные в таблице 2.

Таблица 2

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
тиреоглобулин	100
трийодтиронин	0.007
тироксин	0.248

3.3. Коэффициент вариации результатов определения уровня тиреоглобулина в одном и том же образце не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации ТГ имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1–№5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТГ – соответствие измеренной концентрации ТГ, предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов калибровочной пробы №4 и контрольной сыворотки. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию ТГ измеряли в сыворотке крови, взятой у 350 здоровых людей в возрасте от 21 до 40 лет. Измеренная концентрация не превышала 67,8 нг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ТГ, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

4. Меры предосторожности

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

4.1. Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой от 18 до 24 °С.

4.2. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:

- неспецифических компонентов (ПР (концентрат x 25), ТМБ-Субстратный раствор, Стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах для исследования гормонов и онкомаркеров, производства ООО «НПО «Диагностические системы».

4.3. Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.

4.4. Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.

4.5. Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгатов.

4.6. Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.

4.7. Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или субстрата.

4.8. Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.

4.9. Промывка лунок - важный этап проведения анализа: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются

раствором. Не следует допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.

4.10. Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.

4.11. Необходимо использовать только валидированные дозаторы и оборудование.

4.12. Нельзя изменять процедуру проведения анализа.

4.13. Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

5. Инструкция по безопасности

5.1. Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.

5.2. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении Контрольной сыворотки, были протестированы и определены неактивными в отношении антигена вируса гепатита В (HBsAg), антител к вирусу гепатита С, антител к ВИЧ-1,2 и антигена р24 ВИЧ-1.

5.3. В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.

5.4. Нельзя пипетировать ртом.

5.5. При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.6. При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами, необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами.


5.7. При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.

5.8. Необходимо избегать распыливания образцов или растворов, содержащих образцы. При распыливании немедленно дезинфицировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.

5.9. Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

5.10. После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезинфекции – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дезинфицирующего средства. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



5.11.  xi Некоторые реагенты содержат 0,1% проклин 300. Проклин 300 0,1% - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;
- устройство для промывания планшетов (вошер);
- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. Анализируемые образцы сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Недопустимо использование образцов с добавлением азиды натрия в качестве консерванта!** Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

8. Подготовка реагентов для анализа

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре.

8.1. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут!**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать с помощью скрепки для фольгированного пакета (не удаляя осушитель!). Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. Или поместить вскрытый фольгированный пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком.

8.2. ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл воды). Полученный раствор тщательно перемешать.

8.3. Конъюгат – готов к применению.

8.4. Стандартные калибровочные пробы - готовы к применению.

8.5. Контрольная сыворотка - готова к применению.

8.6. ТМБ-Субстратный раствор - готов к применению.

8.7. Стоп-реагент – готов к применению.

9. Проведение анализа

9.1. Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 50 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки внести по 50 мкл исследуемых образцов сывороток крови в дубликатах.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

9.2. Во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата, стрипы планшета закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать 60 минут при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С на шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин.

9.3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

9.4. Во все лунки отмытого планшета немедленно внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать от 20 до 30 мин в темноте при комнатной температуре.

9.5. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реактанта, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

9.6. **Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-Тироид-Тиреоглобулин» на автоматических ИФА-анализаторах.** Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длинах волн 540 (550) нм, критерий: ОП > 0,500.

10. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

11. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках с контролем ТМБ-Субстратного раствора - не более 0,1.

Необходимо построить калибровочный график по средним величинам ОП «Калибратора 0»; «Калибратора 1»; «Калибратора 2»; «Калибратора 3»; «Калибратора 4»; «Калибратора 5». На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации ТГ, выраженной в нг/мл, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций ТГ в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации ТГ в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

12. Ограничения теста

12.1. Все реагенты набора предназначены для определения тиреоглобулина (ТГ) в сыворотке крови человека. Набор не предназначен для определения тиреоглобулина (ТГ) в слюне, плазме и других образцах человеческого или животного происхождения.

12.2. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры теста могут повлиять на результаты.

12.3. Для разведения образцов сывороток с высоким содержанием Тиреоглобулина следует использовать только «Калибратор 0». Применение других реагентов может привести к ложным результатам.

12.4. Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах данного теста. Любой лабораторный результат является только частью общей клинической картины пациента.

12.5. Набор не предназначен для тестирования образцов сывороток крови новорожденных.

13. Условия хранения и эксплуатации набора

13.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 18 месяцев.

13.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

13.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- Иммуносорбент – пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- ПР - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при комнатной температуре или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.

- Конъюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Стандартные калибровочные пробы - после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флаконов оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- ТМБ-Субстратный раствор - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным Стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

13.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

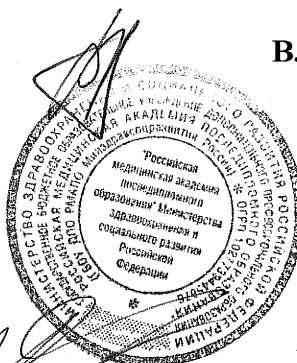
14. Объяснение символов

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Смотрите инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

Директор по производству
ООО «Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»

В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО
Зав.кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России
д.м.н, профессор



Подпись <u>В.В. Долгов</u>
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись <u>[Signature]</u>
"23" 05 2012 года

В.В. Долгов

23.05.2012