

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Департамента
государственного контроля качества,
эффективности, безопасности лекарственных
средств и медицинской техники МЗ РФ
_____ Р.У. Хабриев

«05» января 2001 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АУТОАНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(ТироеИФА-атТГ-1)**

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов
для иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета по
новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 10 от 20 ноября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,
УТВЕРЖДЕННОЙ 17 июля 1998 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТироеИФА-атТГ-1» предназначен для количественного определения аутоантител к тиреоглобулину в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Аутоантитела (АТ) к тиреоглобулину (ТГ) относятся в основном к иммуноглобулинам класса G и реже — к иммуноглобулинам классов A и M. В сыворотке крови здоровых лиц АТ к ТГ могут содержаться в концентрации до 65Ед/мл. Превышение этого порога свидетельствует об аутоиммунном процессе, как правило, приводящем к нарушению функции щитовидной железы. Определение АТ к ТГ в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики аутоиммунных тиреоидных заболеваний (идиопатическая микседема, тиреоидит Хашимото, диффузный токсический зоб).

1.3. Набор «ТироеИФА-атТГ-1» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 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

Набор позволяет определять АТ к ТГ, принадлежащие к любому классу иммуноглобулинов. На первой стадии анализа АТ к ТГ, содержащиеся в калибровочных и исследуемых пробах, связываются с тиреоглобулином, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизованные АТ к ТГ взаимодействуют с конъюгатом ТГ-пероксидаза. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству АТ к ТГ в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации АТ к ТГ в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании

калибровочного графика рассчитывается концентрация АТ к ТГ в определяемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилучных стрипов в рамке с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок ТГ, маркирован «Стрипы с иммобилизованным тиреоглобулином» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по международному референсному препарату ВОЗ 65/093, содержащие известные количества АТ к ТГ; значения концентраций АТ к ТГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, 6 флаконов (по 0,5мл);
- конъюгат ТГ с пероксидазой, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- аналитический буфер, маркирован «БуферА» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 2 флакона (по 20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием АТ к ТГ, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Использование высокоочищенного ТГ для сенсibilизации стрипов и синтеза конъюгата ТГ-пероксидаза обеспечивает высокую специфичность анализа.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения АТ к ТГ в одном и том же образце с использованием набора «ТироидИФА-атТГ-1» не превышает 8%.

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

4.4. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АТ к ТГ в сыворотке крови человека не превышает 10 Ед/мл.

4.5. В наборе «ТироидИФА-атТГ-1» значения концентраций калибровочных проб выражены в Ед/мл. Для пересчета концентрации в мкг/мл следует значение в Ед/мл разделить на 33,3.

4.6. Клиническая проверка. Содержание АТ к ТГ измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 120 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Измеренная концентрация АТ к ТГ не превышала 65 Ед/мл.

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций АТ к 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 1N 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 водопроводной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель 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 стрипах 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 с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;

- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 400 мл;

- стакан стеклянный вместимостью 500 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. Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 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.

7.3. Промывочный буфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10 раз.

Например: 5 мл Буфера Р + 45 мл дистиллированной воды.

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

7.4. Буфер А готов к использованию.

7.5. Конъюгат 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 перед проведением анализа 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 A1 и A2, внести по 100 мкл Буфера А.

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

8.5. Инкубировать стрипы в течение 30 мин. при температуре +37°C при встряхивании в термостатируемом шейкере со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.3, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.7. Во все лунки, кроме лунок А1 и А2, немедленно внести по 120 мкл раствора конъюгата ТГ-пероксидаза.

8.8. Инкубировать стрипы согласно п. 8.5.

8.9. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки согласно п. 8.6.

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

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

8.12. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при 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 B — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости B (ед.опт.плотн.) от концентрации АТ к ТГ в калибровочных пробах (Ед/мл либо мг/л).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $B - B_T$, где B_T — среднее значение оптической плотности лунок А1 и А2.

Определить содержание АТ к ТГ в пробах по калибровочному графику.

8.13. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.11, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение **20 минут** при температуре +2...8°C.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Набор «ТироидИФА-атТГ-1» 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 — 12месяцев.

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;
- конъюгат ТГ-пероксидаза и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1месяца при температуре +2...8°C;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5суток при комнатной температуре (+18...25°C);

· БуферА, 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.

9.3. 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 АТ к ТГ в контрольной сыворотке.

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

9.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ТироидИФА-атТГ-1» обращаться по адресу: 189650, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 596-67-80, или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14А, тел. (095) 120-60-95.

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
Буфер А, 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	30 мин, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Конъюгат Е, мкл	–	120	120	120	120	120	120	120	120
Инкубация № 2	30 мин, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 3	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,
ген. 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.