



Унитарное предприятие  
"Хозрасчетное опытное производство  
Института биорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси"  
Республика Беларусь  
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп.3  
Факс (017) 263-62-57

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОГЛОБУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

### ИФА-ТГ

#### 1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1. Набор ИФА-ТГ предназначен для определения концентрации тиреоглобулина (ТГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител. Набор предназначен для применения только "in vitro".

1.2. ТГ – гликопротеин с молекулярной массой 660 кДа, является основным компонентом коллоида фолликулов щитовидной железы, продуцируется фолликулярными клетками и служит основой для синтеза тиреоидных гормонов: тироксина и трийодтиронина. Повышение уровня ТГ в крови является следствием структурно-функциональных изменений щитовидной железы и наблюдается при различных ее заболеваниях.

В клинике определение уровня ТГ может быть использовано для раннего выявления рецидивов и метастазов высокодифференцированного рака щитовидной железы у оперированных больных (определение уровня ТГ нельзя применять для дооперационной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей щитовидной железы), для оценки эффективности радиойодтерапии метастазов рака щитовидной железы, для определения степени тяжести тиреотоксикоза и контроля за эффективностью его лечения.

1.3. Присутствие аутоантител к ТГ в сыворотке крови может оказывать влияние на результаты определения ТГ. Возможность интерференции (ложного занижения результатов) при определении ТГ необходимо проверять для каждой пробы сыворотки крови с помощью теста на "открытие".

#### 2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

##### 2.1. Состав набора:

конъюгат – моноклональные антитела к ТГ, меченные пероксидазой хрена, концентрированный раствор, 0,9 мл, 1 микропробирка

Иммунсорбент (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами к ТГ, готовый к использованию, 1 шт.;

калибровочные проб ТГ на основе буферной системы в диапазоне концентраций (0, 5 -200) мкг/л (точные значения концентраций ТГ указываются на этикетках), жидкие препараты, готовые к использованию, калибровочная проба  $C_0$  – 6 мл, 1 флакон, калибровочные пробы  $C_1$ - $C_5$  – 5 микропробирок по 0,7 мл;

контрольная проба ТГ для теста на "открытие", содержащая известное количество ТГ (точное значение концентрации ТГ указывается на этикетке флакона), жидкий препарат, готовый к использованию, 4 мл, 1 флакон;

буферный раствор, готовый к использованию, 10 мл, 1 флакон ;  
раствор для разведения конъюгата, готовый к использованию, 20 мл, 1 флакон;

субстратный буферный раствор, 12 мл, 1 флакон;

раствор ТМБ, 1,0 мл, 1 флакон;

промывочный раствор, 20 мл, 1 флакон;

стоп-реагент – жидкий препарат, готовый к использованию, 12 мл, 1 флакон;

контрольные сыворотки КС-1 и КС-2 – лиофилизованные препараты, 2 флакона.

2.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных проб, 6 калибровочных проб и 2 проб контрольных сывороток, всего 96 определений.

2.3. Продолжительность анализа 3,5 ч. Диапазон определяемых концентраций ТГ (5-200) мкг/л.

#### 3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1. При работе с набором следует соблюдать правила работы с химическими веществами

3.2. Стоп-реагент, содержащий серную кислоту, обладает раздражающим действием. При попадании на кожу и

слизистые немедленно промыть большим количеством воды.

3.3. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как данный набор содержит производные крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.4. Работы производить с соблюдением мер предосторожности, предусмотренных приказами МЗ РБ №66 и №351.

3.5. При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.6. Все лица, занятые данными исследованиями, должны проходить обязательный медицинский осмотр, согласно Постановления МЗ РБ №33 от 08.08.2000 г. "О порядке проведения обязательных медицинских осмотров работников".

#### 4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

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

термостат, поддерживающий температуру  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  
полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);;

вихревой смеситель;

магнитная мешалка;

пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 100-500 и 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей (50-300) мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

пробирки пластмассовые с пробками вместимостью (3-5) мл;

стакан стеклянный вместимостью 500 мл, 1 шт.;

чистый флакон из темного стекла вместимостью 20 мл с завинчивающейся крышкой;

флакон вместимостью 10 мл;

перчатки резиновые или пластиковые;

вода дистиллированная;

бумага фильтровальная;

#### 5 ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

5.1. Перед проведением анализа, компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови необходимо выдержать при температуре (18-25) °С в течение 30 мин

5.2. Содержимое флаконов с КС-1 и КС-2 растворить в 1,0 мл дистиллированной воды. Неиспользованные при первой постановке части КС-1 и КС-2 можно хранить при температуре минус 18 °С в течение срока годности набора.

##### 5.3. Подготовка конъюгата.

В чистый флакон вместимостью 10 мл внести 8 мл буферного раствора для разведения конъюгата и 400 мкл концентрированного раствора конъюгата, тщательно перемешать, избегая образования пены. Полученного раствора конъюгата достаточно для заполнения 6 стрипов. Если используется иное количество лунок, необходимо смешать 100 мкл концентрированного раствора конъюгата с 2 мл буферного раствора для разведения конъюгата для одного стрипа (8 лунок).

Раствор конъюгата, подготовленный к использованию, может храниться при температуре (2-8) °С в течение 48 часов.

##### 5.4. Подготовка промывочного раствора.

В мерный стакан вместимостью 500 мл внести 400 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона (20 мл) с промывочным раствором и тщательно перемешать на магнитной мешалке. В случае использования неполного набора стрипов, смешать 1 объем концентрированного промывочного раствора с 20 объемами дистиллированной воды.

**ВНИМАНИЕ!** При выпадении осадка солей в концентрате промывочного раствора необходимо прогреть его при (30-40) °С до полного растворения осадка.

Промывочный раствор, подготовленный к использованию, может храниться в течение 4 недель при температуре (2-8) °С.

##### 5.5. Подготовка ТМБ-субстратного раствора.

Готовят непосредственно перед использованием.

В чистый флакон из темного стекла внести содержимое флакона с субстратным буферным раствором с перекисью водорода и добавить 0,6мл раствора ТМБ, тщательно перемешать. В случае использования неполного набора стрипов,

внести 20 объемов субстратного буферного раствора с перекисью водорода и 1 объем раствора ТМБ.

ТМБ-субстратный раствор хранению не подлежит.

**ВНИМАНИЕ!** Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя мыть синтетическими моющими средствами, так как даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции.

5.6. Подготовка проб для теста на «открытие».

5.6.1. Подготовить необходимое количество пластмассовых пробирок для проб теста на «открытие».

5.6.2. Внести в соответствующие пробирки по 150 мкл исследуемых проб сыворотки крови.

5.6.3. Во все пробирки внести по 150 мкл контрольной пробы ТГ для теста на «открытие», входящей в состав набора. Содержимое пробирок тщательно перемешать с помощью вихревого смесителя.

5.7. Определить количество лунок, необходимых для проведения контроля. Поместить стрипы в рамку. Не использованные стрипы хранить в тщательно закрытом пластиковом пакете.

5.8. Составить протокол маркировки лунок. Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом:

C<sub>0</sub> - C<sub>5</sub> - калибровочные пробы;

Ск<sub>1</sub> и Ск<sub>2</sub> - контрольные сыворотки № 1 и № 2;

Сх - исследуемые пробы сыворотки крови;

Сх-о - пробы теста на «открытие», подготовленные в соответствии с п. 6.5.

## 6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Внести во все лунки по 50 мкл фосфатного буферного раствора.

6.2. Отобрать по 100 мкл и внести в соответствующие лунки:

C<sub>0</sub> - калибровочную пробу C<sub>0</sub>;

C<sub>1</sub> - C<sub>5</sub> - соответствующие калибровочные пробы;

Ск<sub>1</sub> и Ск<sub>2</sub> - контрольные сыворотки № 1 и № 2;

Сх - исследуемые пробы сыворотки крови;

Сх-о - пробы теста на «открытие».

6.3. Перемешать содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности стола. Закрывать планшет крышкой или липкой лентой и инкубировать в течение 2 часов в термостате при температуре 37 °С.

6.4. После окончания инкубации удалить жидкость из всех лунок. Во все лунки внести по 0,3 мл промывочного раствора (п. 5.4.). Сразу после внесения удалить промывочный раствор. Повторить стадию промывки еще 3 раза. Промокнуть планшет, опрокинув его на фильтровальную бумагу и слегка постучав им. После промывки в нем не должно оставаться жидкости.

Для промывки лунок можно использовать автоматические промывающие устройства.

6.5. Сразу после промывки внести во все лунки по 150 мкл раствора конъюгата (п.5.3.).

6.6. Закрывать планшет крышкой или липкой лентой и инкубировать в течение 1 часа в термостате при температуре 37°С.

6.7. За (10-15) мин до окончания инкубации приготовить ТМБ-субстратный раствор (п.5.5.).

6.8. После окончания инкубации промыть лунки 4 раза как описано в п. 6.4.

6.9. Сразу после промывки внести во все лунки по 100 мкл свежеприготовленного ТМБ-субстратного раствора (п. 5.5.).

Время добавления ТМБ-субстратного раствора не должно превышать 2 мин.

6.10. Инкубировать планшет в течение 15-30 мин при температуре (18-25) °С в темноте.

6.11. Остановить реакцию добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-реагента. Добавлять стоп-реагент во все лунки с той же скоростью и той же последовательности, как и ТМБ-субстратный раствор.

6.12. Встряхнуть планшет и измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 450 нм.

Измерения провести не позднее 20 мин после остановки реакции.

## 7 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

7.1. Рассчитать средние арифметические значения ОП для каждой пары лунок

7.2. Построить калибровочную кривую в полугарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения оптической плотности (ОП), а по оси абсцисс (логарифмическая) - значения концентраций ТГ в мкг/л в соответствующих калибровочных пробах.

7.3. Определить по калибровочной кривой концентрацию ТГ в контрольных сыворотках, исследуемых пробах сыворотки крови и пробах теста на «открытие».

7.4. Рассчитать «открытие» (%):

Сх-о мкг/л

----- : 100 = % «открытия»

( Сх мкг/л+ Ск-тг мкг/л ) : 2 где:

Сх-о - концентрация ТГ в пробах теста на «открытие»;

Сх - концентрация ТГ в исследуемых пробах сыворотки крови;

Ск-тг - концентрация ТГ в контрольной пробе ТГ для теста на «открытие», входящей в состав набора (значение концентрации ТГ указано на этикетке флакона).

7.5. Интерпретация результатов:

«Открытие» (%): 80-120 - интерференция отсутствует, 70-80 - интерференция возможна < 70 - интерференция аутоантител.

## 8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1. Специфичность.

В наборе используются высокоспецифичные моноклональные антитела к ТГ для иммобилизации на поверхности лунок и для получения конъюгата с пероксидазой хрена. В данной иммунохимической системе отсутствуют перекрестные реакции с Т<sub>3</sub>, Т<sub>4</sub>, сывороточным альбумином человека, иммуноглобулинами G человека.

8.2. Чувствительность.

Минимальная концентрация ТГ, определяемая с помощью набора, составляет не более 1 мкг/л.

8.3. Воспроизводимость результатов.

Коэффициент вариации результатов определения (n=10) концентрации ТГ в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием ТГ с использованием набора не превышает 10 %.

8.4. Тест на «открытие».

Процент «открытия» ТГ, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией ТГ составляет (80-120) %.

8.5. Тест на параллелизм.

Кривая, отражающая разведение контрольной сыворотки крови с высоким содержанием ТГ, параллельна стандартной калибровочной кривой.

8.6. Клиническая проверка набора.

При использовании набора концентрация ТГ в сыворотке крови здоровых лиц обоего пола находится в диапазоне (0-50) мкг/л, составляя в среднем 19 мкг/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций ТГ соответствующие нормальным.

## 9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Компоненты набора ИФА-ТГ должны храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора. Срок годности набора - 6 месяцев со дня выпуска.

9.2. Не следует держать реактивы на ярком свете во время хранения и инкубации.

9.3. Не смешивать реактивы из разных серий. Не использовать компоненты наборов по истечении срока годности.

9.4. Определение концентрации ТГ с помощью набора «ИФА-ТГ» проводят в сыворотке крови. Образцы сыворотки крови хранят при температуре (2-8) °С, если анализ проводится в течение 48 часов после взятия крови. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре минус 20 °С в течение более длительного времени. Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов. Размораживание образцов проводится при температуре (18-25) °С.

Образцы сыворотки крови с предполагаемым высоким уровнем ТГ рекомендуется разводить «нулевой» калибровочной пробой (C<sub>0</sub>), входящей в состав набора.

9.5. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку, а также сыворотку с повышенным содержанием липидов.

9.6. Для отбора и добавления реагентов необходимо использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимости результатов пипетирования

9.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.