

«УТВЕРЖДАЮ»
Руководитель Департамента
государственного контроля качества,
эффективности, безопасности лекарственных
средств и медицинской техники МЗ РФ
_____ Р.У. Хабриев
«26» декабря 2000 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТРИЙОДТИРОНИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(ТироидИФА-трийодтиронин-01)

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов
для иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета
по новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 9 от 23 октября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,
УТВЕРЖДЕННОЙ 16 декабря 1996 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТироидИФА-трийодтиронин-01» предназначен для количественного определения концентрации трийодтиронина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Трийодтиронин — тироидный гормон с молекулярной массой 651Да. Трийодтиронин является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. Количественное определение концентрации трийодтиронина в крови имеет диагностическое значение при оценке функционального состояния щитовидной железы.

1.3. Набор «ТироидИФА-трийодтиронин-01» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных 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

Принцип работы набора состоит в следующем. В лунках, при добавлении раствора АНС-Т₃, исследуемого образца и конъюгата трийодтиронин-пероксидаза во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным трийодтиронином сыворотки крови за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами трийодтиронина и конъюгата трийодтиронин-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству трийодтиронина в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата трийодтиронин-пероксидаза. После измерения оптической плотности растворов в лунках

на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация трийодтиронина в определяемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к трийодтиронину, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к трийодтиронину» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества трийодтиронина; значения концентраций трийодтиронина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат трийодтиронин-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14мл);
- раствор 8-анилинонафтил-1-сульфо кислоты, маркирован «АНС-Т₃» — 1 флакон (14мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием трийодтиронина, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к трийодтиронину с другими тироидами приведена в таблице.

Таблица

ТИРОИД	Перекрестная реакция, %
L-Трийодтиронин	100,0
L-Тироксин	0,01
L-Дийодтирозин	0,001

4.2. Коэффициент вариации результатов определения трийодтиронина в одном и том же образце с использованием набора «ТироидИФА-трийодтиронин-01» не превышает 8%.

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

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» трийодтиронина — соответствие измеренной концентрации трийодтиронина 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 трийодтиронина в сыворотке крови человека не превышает 0,15 нмоль/л.

4.6. Клиническая проверка. Содержание трийодтиронина измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 120 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Средняя концентрация трийодтиронина составила 1,8 нмоль/л (1,0–2,8 нмоль/л).

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций трийодтиронина, 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 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 стрипах при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200мкл; на 200–1000мкл; на 1000–5000мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300мкл, с наконечниками;
- 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.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к пробкам. Открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5мл дистиллированной воды и закрыть пробки. Выдержать флаконы в течение 10минут при комнатной температуре (+18...25°C). Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

7.2. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30минут. 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 БуфераР развести дистиллированной водой в 10раз.
Например: 5мл БуфераР + 45мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.4. Конъюгат Е готов к использованию.

7.5. Раствор АНС-Т₃ 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. 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. Внести в соответствующие лунки по 50мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

8.4. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100мкл раствора АНС-Т₃.

8.5. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100мкл конъюгата Е.

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

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

8.8. Немедленно внести во все лунки по 100мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.9. 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.

8.10. 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 A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов необходимо использовать формулу $V/V_0 \times 100\%$ для каждой калибровочной или исследуемой пробы, где V — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, V_0 — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу «0 нмоль/л».

В координатах «logit-log» построить для калибровочных проб график зависимости $V/V_0 \times 100\%$ от концентрации трийодтиронина в калибровочных пробах (нмоль/л).

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой $(V - V_T) / (V_0 - V_T) \times 100\%$, где V_T — среднее значение оптической плотности лунок A1 и A2.

Определить содержание трийодтиронина в пробах по калибровочному графику.

8.11. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п.8.9, 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 «ТиродИФА-трийодтиронин-01» 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;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- Конъюгат Е и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- раствор АНС-Т₃ хранить в защищенном от света месте при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- 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, содержащую азид натрия.

9.3. При вскрытии и растворении лиофилизированных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

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 трийодтиронина 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 «ТиродИФА-трийодтиронин-01» 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. 14 А, 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
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
Раствор АНС, мкл	—	100	100	100	100	100	100	100	100
Конъюгат Е, мкл	—	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
4-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	КТ, темное место, 15–30 мин								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 мин								
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 составлена сотрудниками ЗАО «Алкор Био»: зав. лабораторией биотехнологии В.А. Головаченко и ген. директором, к.б.н. Д.Г. Польшцевым.