

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

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(ТироидИФА-ТТГ-1)

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов
для иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета по
новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 8 от 18 сентября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,
УТВЕРЖДЕННОЙ 16 июля 1997 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТироидИФА-ТТГ-1» предназначен для количественного определения концентрации тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ТТГ — гликопротеиновый гормон с молекулярной массой около 30000Да, состоящий из двух субъединиц — альфа и бета. ТТГ секретируется передней долей гипофиза и стимулирует синтез трийодтиронина и тироксина в щитовидной железе. Количественное определение уровня ТТГ в крови имеет диагностическое значение при оценке тиреоидного статуса организма.

1.3. Набор «ТироидИФА-ТТГ-1» 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-ТТГ-1 использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ТТГ. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ТТГ-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ТТГ, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ТТГ-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ТТГ. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ТТГ в исследуемом образце.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ТТГ в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ТТГ в определяемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилучных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ТТГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ТТГ» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Второму международному референсному препарату ВОЗ 80/558, содержащие известные количества ТТГ; значения концентраций ТТГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов; калибровочная проба №1 (0 мкМЕ/мл) — 1 флакон (3,0 мл) и калибровочные пробы №2–№6 — 5 флаконов (по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ТТГ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- 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 с известным содержанием ТТГ, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к β -субъединице ТТГ с хорионическим гонадотропином, фолликулолестимулирующим и лютеинизирующим гормонами.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения ТТГ в одном и том же образце с использованием набора «ТиреоидИФА-ТТГ-1» не превышает 8%.

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

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТТГ — соответствие измеренной концентрации ТТГ 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 ТТГ в сыворотке крови человека не превышает 0,05 мкМЕ/мл.

4.6. Клиническая проверка. Содержание ТТГ измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 140 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Средняя концентрация ТТГ составила 1,37 мкМЕ/мл (0,23–3,4 мкМЕ/мл).

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ТТГ, 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 5–50мкл, 40–200мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, 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 готовы к использованию.

7.2. Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если значения ТТГ в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения концентрации калибровочной пробы №6, образцы следует развести калибровочной пробой № 1 (0 мкМЕ/мл) в 20 раз:

380 мкл калибровочной пробы № 1 + 20мкл исследуемого образца.

При разведении необходимо тщательное перемешивание.

7.3. 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.

7.4. Промывочныйбуфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10 раз. 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.

7.5. Конъюгат анти-ТТГ-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. 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 100мкл конъюгата анти-ТТГ-пероксидаза.

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

8.5. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 1 часа в термостатируемом шейкере при температуре +37°C 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 добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.4, 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. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. 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 тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 мин.

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 A1 и A2 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 ТТГ в калибровочных пробах (мкМЕ/мл).

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой $B - B_T$, где B_T — среднее значение оптической плотности лунок A1 и A2.

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

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 **20 минут** при температуре +2...8°C.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Набор «ТироидИФА-ТТГ-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 — 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;

