

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«» 2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации тиреотропного гормона в сыворотке (плазме) крови

(ТТГ-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Тиреотропный гормон представляет собой гормон гликопротеиновой природы с молекулярной массой около 30000 Да, состоящий из альфа- и бета-субъединиц. Биологическая активность ТТГ обусловлена его бета-субъединицей. ТТГ секретируется передней долей гипофиза и стимулирует синтез и высвобождение гормонов щитовидной железы. Гипофизарная секреция тиреотропного гормона крайне чувствительна к изменению концентрации трийодтиронина и тироксина.

1.3. Количественное определение содержания ТТГ в сыворотке (плазме) крови человека имеет диагностическое значение при оценке тиреоидного статуса организма и может быть использовано для диагностики функциональных нарушений щитовидной железы, гипотиреоза, гипертиреоза, а также для наблюдения за состоянием пациента после заместительной терапии.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного, 6 калибровочных и 1 контрольного образцов, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной и с.н.с. Н.В. Соболевой.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном «сэндвич»- варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител к антигену ТТГ.

В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит связывание сывороточного антигена ТТГ с моноклональными антителами к антигену ТТГ, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и моноклональными антителами к ТТГ, конъюгированными с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окрашивания пропорциональна концентрации ТТГ в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ТТГ в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ТТГ, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащие известные количества ТТГ – 0; 0,25; 1,0; 4,0; 8,0 и 16 мМЕ/л, аттестованные относительно WHO International Standard NIBSC 81/565; концентрации ТТГ в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, не содержащие антитела к ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С, HBsAg и антиген р24 ВИЧ-1; готовые для использования – 6 флаконов (по 0,7 мл);
- контрольный образец на основе инаktivированной сыворотки крови человека с известным содержанием ТТГ, аттестованный относительно WHO International Standard NIBSC 81/565, не содержащий антитела к ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С, HBsAg и антиген р24 ВИЧ-1; готовый для использования – 1 флакон (0,7 мл);
- конъюгат моноклональных антител к ТТГ с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для разведения сывороток – 1 флакон (12 мл);
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

- плёнка для заклеивания планшета – 1 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночка для реагента – 2 шт.;
- наконечники для дозатора на 5-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрёстной реакции моноклональных антител к бета-субъединице ТТГ с хорионическим гонадотропином, фолликулостимулирующим гормоном и лютеинизирующим гормоном.

3.2. Хук-эффект высоких концентраций при исследовании сывороток (плазмы) крови не был обнаружен вплоть до концентрации ТТГ 1200 мМЕ/л.

3.3. Использование в наборе реагентов специфических блокирующих агентов исключает возможность получения ложноположительных результатов в сыворотках (плазмах) крови, содержащих гетерофильные, в том числе антимышинные (НАМА), антитела.

3.4.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации ТТГ в лунках, содержащих контрольный образец, не превышает 8%.

3.5.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации ТТГ при разведении калибровочных образцов, содержащих 16; 8,0; 4,0 мМЕ/л ТТГ, в 2 раза, и калибровочного образца 1,0 мМЕ/л в 4 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.6.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ТТГ предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца с концентрацией ТТГ 1,0 мМЕ/л. Процент «открытия» составляет 90-110 %.

3.7.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация ТТГ, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 0,05 мМЕ/л.

3.8. Клиническая проверка. Концентрация ТТГ, измеренная в сыворотке (плазме) крови, взятой с 9 до 11 ч, у 367 здоровых мужчин и женщин в возрасте 20-50 лет, находилась в диапазоне 0,3-4,0 мМЕ/л.

3.9. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации ТТГ, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки (плазмы) крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , дез-охлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назна-

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °С и 400-800 об/мин;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа следует использовать сыворотку и плазму крови (с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА).

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

6.4. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки

плазмы) крови следует выдерживать при температуре от 18 до 25 °С в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок.

Хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.4. Подготовка калибровочных образцов и контрольного образца.

Калибровочные образцы и контрольный образец готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения. Перед использованием встряхнуть.

Калибровочные образцы и контрольный образец после первого вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Конъюгат после вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

Необходимо исключить воздействие света на раствор тетраметилбензидина плюс.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Раствор ТМБ плюс после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.8. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждого калибровочного образца и по 50 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин, при условии использования всех лунок планшета.

7.9. Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 1 °C и 650 об/мин.

7.11. По окончании инкубации снять пленку и удалить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.3). Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре 37 ± 1 °C и 650 об/мин.

Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.13. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента, встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху).

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации ТТГ в калибровочных образцах (мМЕ/л).

9.3. Определить концентрацию ТТГ в контрольном образце и анализируемых образцах

по калибровочному графику. Вычислить среднее арифметическое значение концентрации для каждой пары лунок, содержащих контрольный и исследуемые образцы.

9.4. Если концентрация ТТГ в анализируемых образцах сыворотки (плазмы) крови превышает 16 мМЕ/л, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов ТТГ-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес).

10.2. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта с соблюдением условий и требований, установленных на данном виде транспорта, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- калибровочные образцы, контрольный образец и конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

10.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ТТГ в контрольном образце.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (раствор ТМБ плюс, ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.7. Не допускается применение серии набора по истечении срока ее годности.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора ТТГ-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 363-20-60, 227-75-43, тел./факс (383) 363-35-55.

E-mail: ybobtk@vector-best.ru

Старший научный сотрудник

ЗАО «Вектор-Бест»

Н.В. Соболева

Зав. лабораторией НИИ СД

ЗАО «Вектор-Бест»

Н.Н. Сорокина

Директор НИИ СД

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»

Ректор ГБОУ ВПО

Саратовский ГМУ

им. В.И. Разумовского

Минздрава России, д.м.н.

М.П.



В. М. Попков

Минздрава России

В.М. Попков

“ 11 ”

2014 г.

“ //

2016 г.