



УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения и
социального развития



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации свободной фракции тироксина в сыворотке крови
(Т₄ свободный-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов Т₄ свободный-ИФА-БЕСТ предназначен для количественного определения концентрации свободной фракции тироксина (Т₄_{св}) в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тироксин – тироидный гормон с молекулярной массой около 777 Да, синтезируемый щитовидной железой. В сыворотке крови тироксин находится в основном в комплексе с тироксин-связывающими белками, доля несвязанного – свободного гормона (Т₄_{св}) составляет примерно 0,03% от общей концентрации тироксина. Концентрация Т₄_{св} не зависит от уровня связывающих белков и отражает истинный тироидный статус.

1.3. Количественное определение содержания Т₄_{св} в крови человека имеет диагностическое значение при оценке функционального состояния щитовидной железы.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит конкурентное связывание

Инструкция составлена: заместителем директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и зав. лабораторией И.М. Скударновой - сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест».

свободной фракции сывороточного тироксина и тироксина, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к тироксину, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации $T_4_{св}$ в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация $T_4_{св}$ в анализируемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными моноклональными антителами к тироксину, готовый для использования – 1 шт;
 - калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по «Liphocheck Immunoassay Plus Control Abbott Architect T4 free»; содержащие известные количества $T_4_{св}$ – 0; 5; 10; 20; 40 и 80 пмоль/л; концентрации $T_4_{св}$ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,7мл);
 - контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием $T_4_{св}$, готовая для использования – 1 флакон (0,7 мл);
 - конъюгат тироксина с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,3 мл);
 - раствор для разведения конъюгата – 1 флакон (12 мл);
 - промывочный раствор, концентрат – 1 флакон (28 мл);
 - раствор для разведения тетраметилбензидина – 1 флакон (12 мл);
 - тетраметилбензидин, концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
 - стоп-реагент (1М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
 - пленка для заклеивания планшета – 2 шт;
 - трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.
- По желанию потребителя дополнительно поставляются:
- ванночка для реагента – 2 шт;
 - наконечники для пипетки на 4-200 мкл – 16 шт.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрёстной реакции моноклональных антител к T_4 с тироксином в составе комплексов, трийодтиронином и дийодтиронином.

4.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания $T_4_{св}$ в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора T_4 свободный - ИФА-БЕСТ не превышает 8 %.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации $T_4_{св}$ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей $T_4_{св}$, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5-80 пмоль/л и составляет 90-110 %.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации $T_4_{св}$ предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 10 пмоль/л. Процент «открытия» составляет 90-110 %.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация $T_4_{св}$, не превышает 1,0 пмоль/л.

4.6. Клиническая проверка. Концентрацию $T_4_{св}$, измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 127 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет. Средняя концентрация $T_4_{св}$ составила 15,6 пмоль/л (10 – 25 пмоль/л).

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации $T_4_{св}$, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

5.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо поражённый участок промыть большим количеством проточной воды.

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. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

5.6. Запрещается приём 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 проводить измерения оптической плотности раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 26 ± 1 °C и 400-600 об/мин;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру 2-8 °C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 50 и 100 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 50, 100 и 250 мкл;
- насос водоструйный;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы следует выдержать при комнатной температуре (18-25 °C) в течение времени не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить в холодильнике при температуре 2-8 °C в течение 1 мес.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора перенести в мерную колбу вместимостью 1000 мл, добавить 672 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30–40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 2–8 °С не более 4 недель.

7.4. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до начала проведения анализа! Использовать в течение 1 ч после приготовления.

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

7.5. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до окончания первой инкубации! Использовать в течение 20 мин после приготовления.

В таблице приведён расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

Таблица.

Количество используемых стрипов	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	тетраметилбензидин, концентрат, мл	Раствор для разведения тетраметилбензидина, мл
2	0,2	2,0	0,14	2,0
3	0,3	3,0	0,21	3,0
4	0,4	4,0	0,28	4,0
5	0,5	5,0	0,35	5,0
6	0,6	6,0	0,42	6,0
7	0,7	7,0	0,49	7,0
8	0,8	8,0	0,56	8,0
9	0,9	9,0	0,63	9,0
10	1,0	10,0	0,70	10,0
11	1,1	11,0	0,77	11,0
12	1,2	12,0	0,84	12,0

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и по 50 мкл контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50

мкл анализируемых образцов сыворотки крови. Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение 15-20 мин.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. п. 7.4), заклеймить планшет пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 26 ± 1 °C.

8.4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием; промыть, добавляя во все лунки по 250 мкл рабочего промывочного раствора, с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 5 раз. После каждой промывки тщательно удалять остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.5), заклеймить планшет пленкой и инкубировать в темноте в течение 10–15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 26 ± 1 °C.

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

8.7. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 20 мин.

8.8. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от заданной концентрации $T_4_{св}$ в калибровочных пробах (пмоль/л).

8.9. Определить содержание $T_4_{св}$ в контрольной сыворотке и в анализируемых пробах по калибровочному графику.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Набор реагентов T_4 свободный-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя в холодильнике при температуре 2-8 °C в течение всего срока годности (6 мес.). Допускается хранение набора при температуре до 25 °C не более 3 сут.

Замораживание набора не допускается.

9.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете в холодильнике при температуре 2–8 °C в течение всего срока годности;

- концентрат промывочного раствора, раствор для разведения конъюгата, концентрат тетраметилбензидина, раствор для разведения тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах в холодильнике при температуре 2–8 °C в течение всего срока годности;

- калибровочные пробы, контрольную сыворотку и концентрат конъюгата после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах в холодильнике при температуре 2–8 °C не более 1 мес;

- рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (18–25 °C) не более 1 ч;

- рабочий промывочный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 2–8 °C не более 4 недель;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 20 мин;

- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации $T_{4_{св}}$ в контрольной сыворотке.

9.3. Для представления результатов измерений концентрации свободной фракции тироксина в пг/мл, применять коэффициент пересчета 0.775 (1 пг/мл $T_{4_{св}}$ = 0,775 пмоль/л $T_{4_{св}}$).

9.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

9.5. Образцы сыворотки крови можно хранить в холодильнике при температуре 2–8 °C не более 24 ч или при температуре минус 20 °C (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сывороток крови не допускается.

9.6. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

9.7. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

По вопросам, касающимся качества набора Т₂ свободный-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (3832) 36-73-46, 32-37-58, тел./факс (3832) 36-60-30, 32-67-52,

и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» МЗ РФ по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (095) 120-60-95; 120-60-96.

Зам. директора ИНИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Зав. лабораторией
ЗАО «Вектор-Бест»



Н.М. Скударнова