

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2011 г.

№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Ю. С. Лебедин

11 января 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения
свободного тироксина в сыворотке (плазме) крови**

«свТ₄-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «свТ₄-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации свободного тироксина в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тироксин (Т₄) и 3,5,3'-тироксин (Т₃) – гормоны, вырабатываемые щитовидной железой и циркулирующие в крови, как в свободной, так и в связанной форме – в основном, с тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ). Гормональной активностью обладают только свободные формы Т₃ и Т₄, однако их доля очень мала: 0,03% от общего содержания для Т₄ и 0,3% - для Т₃. Концентрация Т₄ в сыворотке крови – наиболее общепринятый показатель функции щитовидной железы, позволяющий довольно четко разграничивать гипер-, гипо- и эутиреоз.

Повышение содержания общего Т₄ наблюдается при гипертиреозе, при опухолях гипофиза, при состояниях с повышенным уровнем ТСГ (беременность, острый или хронический активный гепатит, эстрогенсекретирующие опухоли или прием эстрогенов, генетически обусловленное повышение), при приеме оральных контрацептивов, героина, метадона, тиреоидных препаратов, ТТГ, тиреолиберина.

Снижение содержания общего Т₄ наблюдается при гипотериозе, пангипопитуитаризме, состояниях с пониженным уровнем ТСГ (акромегалия, нефротический синдром, гипопроteinемия, хронические заболевания печени, андрогенсекретирующие опухоли или прием андрогенов, генетически обусловленное снижение), гемолизе, физической нагрузке, при приеме аминосалициловой и ацетилсалициловой кислот, глюкокортикостероидов, сульфаниламидов, холестирамина, резерпина, йодида калия, трийодтиронина.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение свТ₄ в сыворотке (плазме) крови используется обычно для клинической лабораторной диагностики патологий щитовидной железы различной этиологии

1.4. Область применения - клиническая лабораторная диагностика

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение свободного тироксина основано на использовании конкурентного варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На

внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к T_4 . Свободный тироксин из образца конкурирует с конъюгированным T_4 за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу.

Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации свТ₄ в исследуемом образце. Концентрацию свТ₄ в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания свТ₄ в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- планшет 96-луночный стрипированный с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок мышинными моноклональными антителами; готов к использованию - 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества свободного тироксина – 0; 5; 10; 25; 50 и 100 пмоль/л; концентрации свТ₄ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 6 пробирок или флаконов (по 0,8 мл каждая);
- конъюгат; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ); готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием свТ₄; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);
- концентрат отмывочного раствора 21-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);
- стоп-реагент; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- липкая лента с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;
- аналитический паспорт;
- Инструкция по применению Набора.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к T_4 с другими анализатами приведена в Таблице.

Аналит	Перекрестная реакция %
T_3	0,5
L-тироксин	100
D-тироксин	30

3.2. Чувствительность Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «свТ₄-ИФА» концентрация свТ₄ в сыворотке (плазме) крови не превышает 1,5 пмоль/л.

3.3. Воспроизводимость Коэффициент вариации результатов определения содержания свТ₄ в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов

«свТ₄-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации свТ₄ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 10 пмоль/л

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации свТ₄ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей свТ₄, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5-100 пмоль/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Единицы	
	пмоль/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры		
до 60 лет	10,0	25
старше 60 лет	10,0	21
Беременные:		
1-й триместр	9,0	26
2-й триместр	6,0	21
3-й триместр	6,0	21

В соответствии с требованиями **GLP** (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «свТ₄-ИФА» уточнить значения концентрации свТ₄, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности-соблюдение «Правил 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. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- **фотометр вертикального сканирования**, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- **дозаторы** со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 0,5-250 мкл;
- **термостат**, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1^\circ\text{C}$;
- **цилиндр мерный** вместимостью 500 мл;
- **вода дистиллированная**;
- **перчатки резиновые или пластиковые**;
- **бумага фильтровальная**.



6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 24 ч или при температуре минус 20°C не более 2 недель.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов «свТ₄-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации свТ₄ в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 2 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 10 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 25 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.2. Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата.

7.3. Заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в

течение 60 мин при температуре $+37^{\circ}\text{C}$.

7.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.5. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение 10-20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.6. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – десятичный логарифм концентрации свТ₄ в калибровочных пробах (пмоль/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП₄₅₀). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика использовать интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию свТ₄ в калибровочной пробе 0 пмоль/л к несущественно малой величине, например 0,001 пмоль/л.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание свТ₄ в исследуемых образцах.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «свТ₄-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 сут.

Допускается однократное замораживание (-20°C) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестных образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки – всего 96 определений при

использовании всего комплекта стрипов.

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;
- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20°C в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 5 сут. или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 30 сут.;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «свТ₄-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА» _____ к.б. н. Д. С. Кострикин
М.П.
11 января 2011 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГОУ ДПО РМАПО Росздрава _____ д.м.н., профессор В. В. Долгов
М.П.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«ХЕМА»
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ЛЕБЕДИН ЮРИЙ СТЕПАНОВИЧ