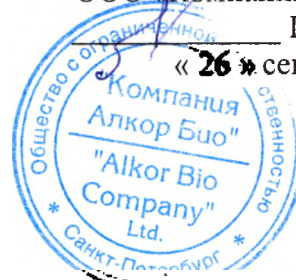


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
«26» сентября 2016г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА («ТироидИФА-ТТГ»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. ТТГ — гликопротеиновый гормон с молекулярным весом около 30 000 Да, состоящий из двух субъединиц — альфа (α) и бета (β). 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 тироидного статуса организма.

1.3. Набор «ТироидИФА-ТТГ» 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 (всего 96 определений).

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ, УЧАСТВУЮЩЕМУ В ВЫПОЛНЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием, окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп патогенности. Персонал, проводящий исследования с использованием данного набора реагентов, должен владеть навыками проведения молекулярно-биологических исследований и работы на соответствующем оборудовании.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

3.1. Принцип действия

В наборе «ТироидИФА-ТТГ» 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 (Рис.1).

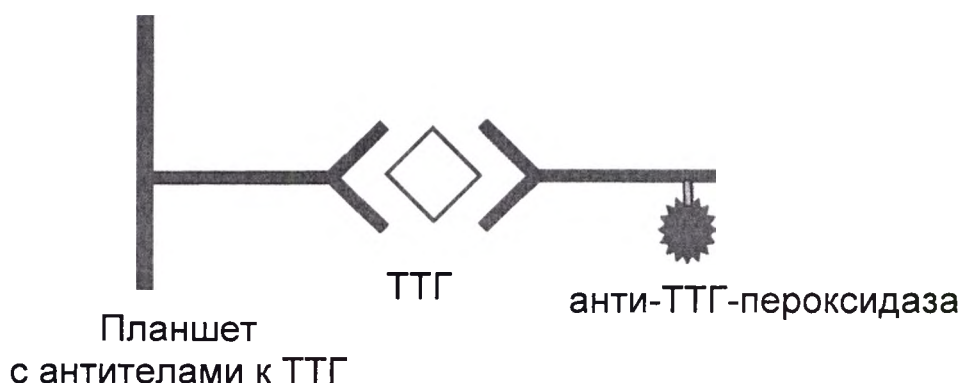


Рисунок 1. Схема анализа

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 исследуемых образцах.

3.2 Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ТТГ, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ТТГ» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), аттестованные по Третьему международному стандарту на ТТГ человека WHO 81/565, содержащие известные количества ТТГ. Точные значения концентраций ТТГ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 0,25; 0,75; 2,5; 7,5 и 15 мкМЕ/мл – 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат анти-ТТГ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (3,0 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 2 флакона (14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием ТТГ, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

фолликулостимулирующим гормонами.

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

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ТТГ в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90–110 %.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТТГ — проверка соответствия значения определяемой концентрации ТТГ расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и КП №6. 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. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ТироидИФА-ТТГ» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ТТГ 800 мкМЕ/мл.

4.7. Диапазон ожидаемых значений. 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).

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012г.).

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н 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, разрешенные на территории РФ, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных 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.

5.8. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5.9. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями

СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

5.10. Все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СП 2.1.7.2790-10 и МУ-287-113.

5.11. Перед началом работы ознакомиться с инструкцией и применять набор строго по назначению.

5.12. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

5.13. Не использовать набор по истечении срока годности.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37 °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- одноразовые резиновые перчатки, разрешенные к применению на территории РФ;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

7.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку. Для проведения анализа не разрешается использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

7.2. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2...8 °С не более 2 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20 °С или ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Подготовка реагентов

8.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25 °С) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

8.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и

контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

8.1.3. Конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата Е на один стрип составляет 1,15 мл.

8.1.4. Буфер Д готов к использованию.

8.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

8.1.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

8.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

8.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25 °С).

В приложении 1 приведена схема проведения анализа.

8.1.9. Разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если по предварительным данным концентрация или по результатам анализа (см. п. 9.3.) значения концентрации ТТГ в исследуемых образцах выше КП №6, образцы следует развести буфером Д в 20 раз. Пример подготовки образца к анализу:

380 мкл буфера Д + 20 мкл исследуемого образца.

При разведении необходимо тщательное перемешивание.

8.2. Постановка анализа

8.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — №2 для измерения величины оптической плотности КП№1;

C1, C2 — №3 для измерения величины оптической плотности КП№2;

D1, D2 — №4 для измерения величины оптической плотности КП№3;

E1, E2 — №5 для измерения величины оптической плотности КП№4;

F1, F2 — № 6 для измерения величины оптической плотности КП№5;

G1, G2 — № 7 для измерения величины оптической плотности КП№6;

H1, H2 — №8 для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

8.2.2. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл раствора конъюгата анти-ТТГ-пероксидаза.

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

Примечание: общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

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

8.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.5., встряхнуть

рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

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

***Примечание:** максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.*

8.2.7. 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 минут.

8.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.7., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре не более +18...25 °C.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

***Примечание:** среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед. ОП.*

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации ТТГ (мКМЕ/мл) в калибровочных пробах (Рис.2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

***Примечание 1:** для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».*

***Примечание 2:** для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.*

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T,$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

B_T — среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

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

10.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации ТТГ, превышающих номинал КП №6, не допускается. Для точного определения концентрации в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п. 7.1.9.

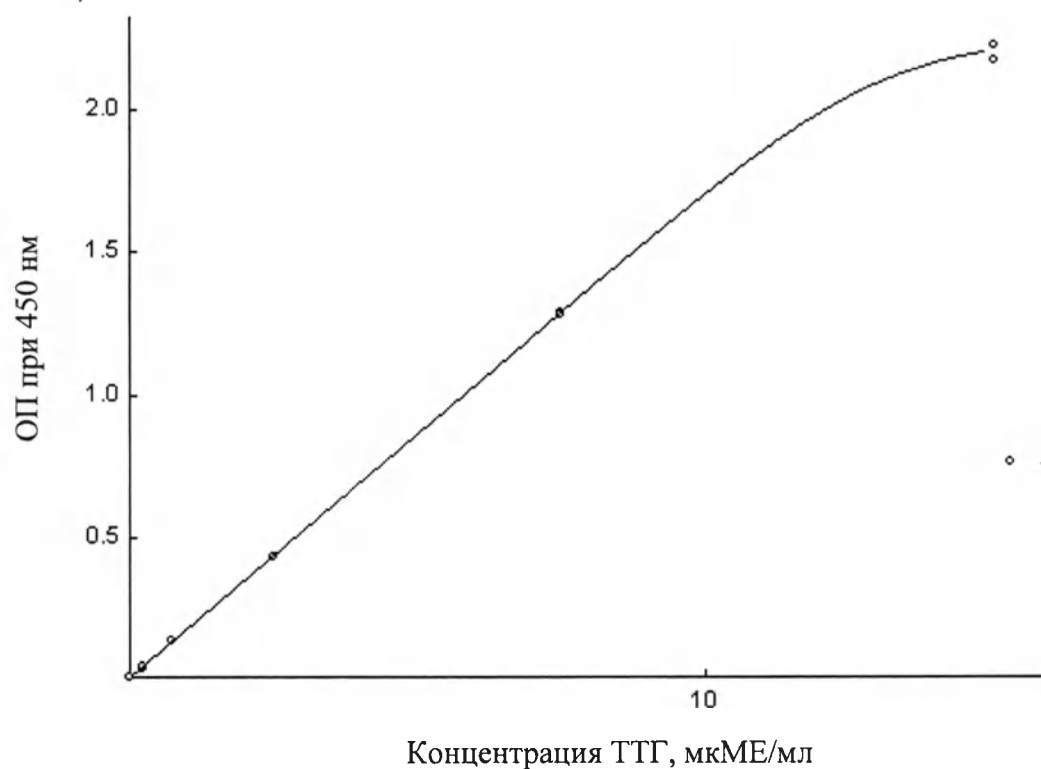


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Набор «ТироидИФА-ТТГ» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

11.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

11.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- конъюгат Е, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

11.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4 эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ТТГ в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

11.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

11.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

11.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

11.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

12.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$. Допускается транспортирование набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 суток.

12.2. Набор, транспортируемый с нарушением температурного режима,

применению не подлежит.

13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

13.1. При утилизации отходов необходимо руководствоваться санитарно-эпидемиологическими правилами СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

13.2. После использования стрипы, калибраторы, контроли, образцы и все расходные материалы, которые контактировали с образцами во время обработки, хранения или анализа (флаконы, перчатки, наконечники и т.д.) должны собираться отдельно и стерилизоваться в автоклаве. Вместо автоклавирования наконечники могут быть стерилизованы дезинфицирующим средством. После стерилизации все компоненты и расходные материалы могут быть утилизированы как неопасный мусор. Другие компоненты набора должны быть утилизированы как обычный мусор.

14. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам качества набора «ТироидИФА-ТТГ» обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д. 40, тел/факс: (812) 677-8779.

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



Варнавичус П.К.
« 25 » 10 2016

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приложение 1

№	Стадия (операция)	Реагенты	Темпера- тура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	100 мкл конъюгата анти-ТТГ- пероксидазы	КТ (+18 - +25°C)	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		50 мкл КП и КС			
3		50 мкл исследуемых образцов			
4	Инкубация	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 500 – 800об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывоч- ного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H ₂ O
6	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15-30'	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
9	Перемешивание	—	КТ	1 – 2'	шейкер
10	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм
11	Обработка результатов	—			Калькулятор и масштабная бумага/ соответствующее ПО

Примечания: КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка; ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C); ПО — программное обеспечение.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 10 ЛИСТОВ

2016 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

