

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от « » 20 г. №

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.
«12» апреля 2010г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТРИЙОДТИРОНИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ТироидИФА-свободныйТ3»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТироидИФА-свободныйТ3» предназначен для количественного определения концентрации свободного трийодтиронина (Т3) в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Трийодтиронин (3,5,3'-трийодтиронин, Т3) – тироидный гормон с молекулярной массой 651Да. Трийодтиронин является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. Основная часть молекул трийодтиронина находится в связанной с белками плазмы форме. Доля свободного Т3 составляет 0,2 – 0,5% от общего трийодтиронина. Именно свободный трийодтиронин обеспечивает весь спектр метаболической активности и осуществляет обратную связь с гипофизом. Его концентрация наиболее точно характеризует тироидный статус организма, так как в значительно меньшей степени, по сравнению с общим трийодтиронином, зависит от физиологического или патологического состояний организма (беременность, оральная контрацепция, стероидная терапия). Таким образом, уровень свободного Т3 отражает истинный тироидный статус.

Измерение концентрации свободного Т3 наиболее информативно в случаях Т3-тиреотоксикоза, синдрома эутиреоидного больного, при генерализованной резистентности к тироидным гормонам, при классификации тиреотоксикозов по степени тяжести и мониторинге антигипотиреоидной терапии.

Уменьшение концентрации свободного Т3 может указывать на первичный, вторичный, третичный гипотиреоз. Однако в некоторых случаях снижение уровня свободного Т3 наблюдается также и при нетиреоидных заболеваниях – некомпенсированной первичной надпочечниковой недостаточности, тяжелых соматических и психических патологиях, в период выздоровления после тяжелых заболеваний, при низкокалорийной диете или диете с низким содержанием белка.

Повышенный уровень свободного Т3 наблюдается при тиреоидитах, синдроме резистентности к тироидным гормонам, ТТГ-независимом тиреотоксикозе, при тиреотропине и тиреотоксической аденоме, токсическом зобе, изолированном Т3-токсикозе. Кроме того, повышение уровня свободного Т3 возможно при послеродовой дисфункции щитовидной железы, нефротическом синдроме, хронических заболеваниях печени, после гемодиализа.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, 1 пробы контрольной сыворотки и 1 пробы для измерения

значения 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. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ТиродИФА-свободныйТ3» использован вариант конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата Т3-пероксидаза, во время инкубаций конъюгат Т3-пероксидаза и свободный Т3 сыворотки крови конкурируют за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Не связавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству свободного Т3 в исследуемом образце (Рис. 1).

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации свободного Т3 в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного Т3 в исследуемых образцах

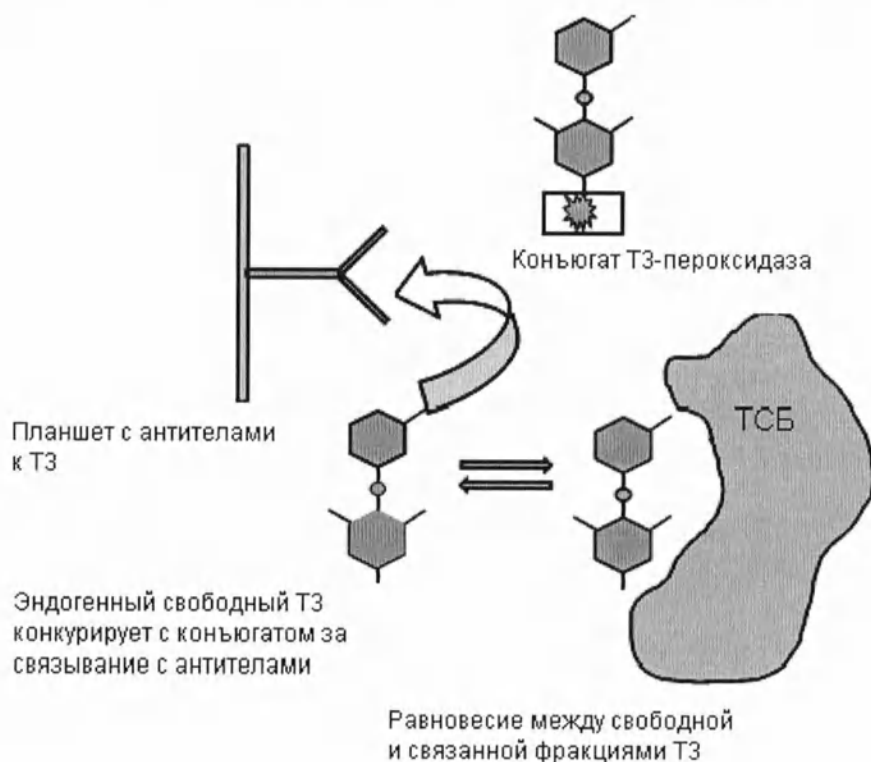


Рисунок 1. Схема анализа

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с моноклональными антителами к трийодтиронину, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к трийодтиронину» — 1 упаковка;
- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества свободного Т3. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций свободного Т3 в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 1; 4; 13; 30, 60 пмоль/л – 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 1,0 мл);

- конъюгат ТЗ-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» – 1 флакон (14 мл);
- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» – 1 флакон (10 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 свободного ТЗ, маркирована «Контрольная сыворотка» – 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 1,0 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к трийодтиронину с другими тироидами приведена в Таблице 1.

Таблица 1

Тироид	Перекрестная реакция, %
ТЗ	100
L-Тироксин	< 0.1
D-Тироксин	< 0.1
r-ТЗ	< 0.1
Дийодотирозин	< 0.1

3.2. Коэффициент вариации результатов определения свободного ТЗ в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «ТироидИФА-свободныйТЗ» не превышает 8%.

3.3. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация свободного ТЗ в анализируемом образце не превышает 0,5 пмоль/л.

3.4. Диапазон ожидаемых значений. Содержание свободного ТЗ измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 200 здоровых лиц в возрасте 18–45 лет. Диапазон измеренных концентраций составил 2,5 – 7,5 пмоль/л. Этот диапазон может быть использован в качестве ориентировочного показателя нормы.

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.

Примечание: в наборе «ТироидИФА-свободныйТЗ» значения концентраций калибровочных проб выражены в пмоль/л. Для пересчета концентраций свободного ТЗ в нг/мл необходимо значение концентрации в пмоль/л разделить на 0,651.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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

4.4. 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.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, 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.

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

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

5. 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°C;
- 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;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. 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.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. 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 1,0 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) 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.

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

7.1.4. Буфер А готов к использованию. Расход буфера А на один стрип составляет 1,0 мл.

7.1.5. 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.

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

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию.

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

В приложении 1 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. 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.

7.2.2. В лунки для исследуемых образцов внести по 80 мкл буфера А.

Примечание: В лунки для калибровочных проб, контрольной сыворотки и ТМБ буфер А не вносить.

7.2.3. Внести в соответствующие лунки по 100 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки в дубликатах.

7.2.4. В лунки для исследуемых образцов - по 20 мкл образцов сыворотки крови в дубликатах.

Внимание: объем вносимых калибровочных проб и образцов различается!

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.

7.2.5. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 45 минут в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 400-650 об/мин.

7.2.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавить 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.

7.2.7. Немедленно внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 100 мкл конъюгата ТЗ-пероксидаза.

7.2.8. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 15 минут в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 400-650 об/мин.

7.2.9. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки согласно п. 7.2.6.

7.2.10. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 20 минут.

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.

7.2.11. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1-2 минут.

7.2.12. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.11., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре +18...25°C.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. 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.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации свободного ТЗ в калибровочных пробах (пмоль/л) (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 пользоваться формулой 1 или 2.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов для каждой калибровочной или исследуемой пробы использовать формулу:

$$B/B_1 \times 100\%, \quad (1)$$

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2, то использовать формулу:

$$(B - B_T) / (B_1 - B_T) \times 100\%, \quad (2)$$

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

B_1 – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу №1,

B_T – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2.

9.2. Определить содержание свободного ТЗ в пробах по калибровочному графику.

9.3. Для образцов крови со значениями оптической плотности выше оптической плотности нулевого калибратора (В1) принимать значение концентрации «ниже 0,5 пмоль/л».

9.4. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации свободного ТЗ, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6».

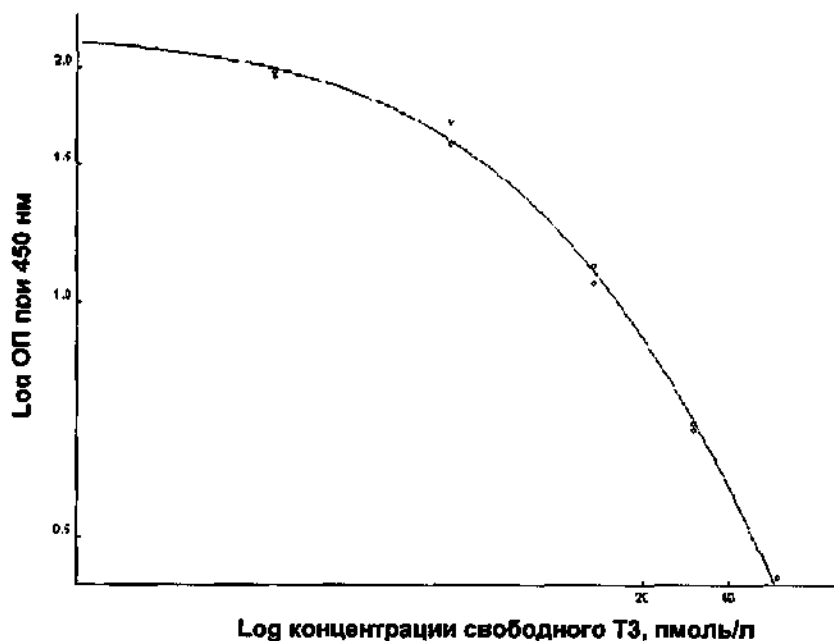


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ТироидИФА-свободныйТЗ» 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.

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

10.3. 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°C в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- буфер А, конъюгат Е и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при

комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток;

- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

10.4. 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 свободного ТЗ в контрольной сыворотке;

- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ, буфера А 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.

10.5. 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.

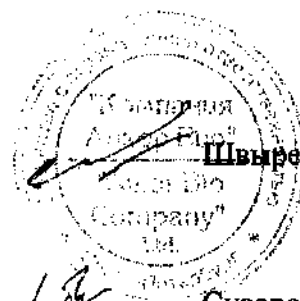
10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

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

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ТиродИФА-свободныйТЗ» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, телефон/факс: (812) 596-76-80.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



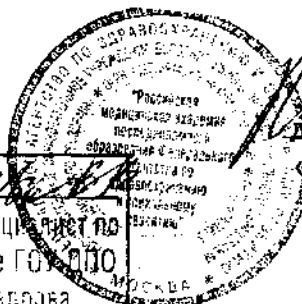
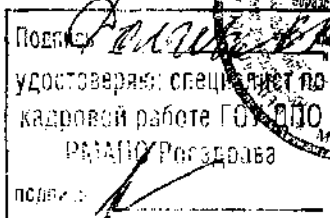
Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био»

Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.
«август» 2010г.

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	80 мкл буфера А в лунки для исследуемых образцов	КТ +18 ... +25°C	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	Буфер А НЕ вносится в лунки для КП и КС В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		100 мкл КП и КС			
3		20 мкл исследуемых образцов			
4	Инкубация №1	—	+37°C	45'	Термостатируемый шейкер, 400 – 650 об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (4 раза)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H ₂ O
5	Внесение конъюгата	100 мкл конъюгата ТЗ-пероксидазы			Конъюгат ТЗ-пероксидаза не вносить в лунки для определения ОП ТМБ
6	Инкубация с №2	—	+37°C	15'	Термостатируемый шейкер, 400 – 650 об/мин
7	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (4 раза)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H ₂ O
8	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
7	Инкубация с ТМБ	—	КТ	20'	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 к таблице: ПО — программное обеспечение; КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка; ОП — оптическая плотность; КТ — комнатная температура (+18...25°C).

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 9 (девятый) лист об

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
 М.В. Швырев