

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации общего тироксина в сыворотке крови
(Т₄ общий-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации общего тироксина в сыворотке крови «Т₄ общий-ИФА-БЕСТ» предназначен для определения концентрации общего тироксина (Т₄ общ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тироксин – тироидный гормон с молекулярной массой около 777 Да, синтезируемый щитовидной железой. В сыворотке крови тироксин находится преимущественно в комплексе с тироксин-связывающими белками, доля несвязанного – свободного гормона составляет примерно 0,03% от общей концентрации Т₄.

1.3. Количественное определение содержания Т₄ общ в сыворотке крови может быть использовано для оценки функционального состояния щитовидной железы.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, происходит разрушение комплексов тироксин – транспортный белок и конкурентное связывание сывороточного тироксина и тироксина, конъюгированного с

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, нач. лаборатории ИФА гормонов и опухолевых маркёров С.В. Шеметовым и научным сотрудником лаборатории ИФА гормонов и опухолевых маркёров НИИ СД А.Р. Молчановой

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 общ в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация T_4 общ в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) <i>Описание</i>	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к T_4 общему	1 шт.
Калибровочные образцы (К1, К2, К3, К4, К5, К6) <i>Содержат известные количества T_4 общего - 0; 10; 50; 100; 200 и 400 нмоль/л. Содержит фенол (0,16%), ProClin 300 (0,05%).</i>	6 фл., по 0,7 мл
Контрольный образец (КО) <i>Содержит количество T_4 общего в пределах, указанных в паспорте и на этикетке флакона, нмоль/л. Содержит фенол (0,16%), ProClin 300 (0,05%).</i>	1 фл. 0,7 мл
Конъюгат, концентрат <i>Конъюгат тироксина с пероксидазой хрена, концентрат. Содержит ProClin 150 (0,044%), фенол (0,08%)</i>	1 фл. 1,3 мл
Раствор для разведения конъюгата (РРК) <i>Содержит ProClin 150 (1%)</i>	1 фл. 13,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) <i>Содержит ProClin 300 (0,25%)</i>	1 фл. 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) <i>Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,1%).</i>	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент <i>Содержит кислоту серную (4,9%).</i>	1 фл., 12,0 мл
Пленка для заклеивания планшета	1 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.
Трафарет для построения калибровочного графика	1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемые в наборе моноклональные антитела обеспечивают высокую специфичность выявления T_4 общ. Не обнаружено перекрёстной реакции моноклональных антител с трийодтиронином (до 5 мкг/мл) и диiodтиронином (до 60 мкг/мл).

3.2.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации T_4 общ в контрольном образце не превышает 8%.

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации T_4 общ при разведении калибровочных образцов, содержащих 400; 200; 100 нмоль/л T_4 общ в 2 раза и 50 нмоль/л в 5 раз. Процент линейности составляет 90-110 %.

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации T_4 общ, предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 50 нмоль/л T_4 общ. Процент «открытия» составляет 90-110 %.

3.5.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация T_4 общ, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 минус 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 5 нмоль/л.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация T_4 общ, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 105 здоровых мужчин и женщин в возрасте 20-50 лет, находилась в диапазоне 52÷155 нмоль/л.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации T_4 общ, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

3.8. Хук-эффект высоких концентраций не был обнаружен вплоть до концентрации T_4 общ 1000 нмоль/л.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.12 № 4н).

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор тетраметилбензидина плюс обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора тетраметилбензидина плюс на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 300, ProClin 150, фенол, кислоту серную, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2.

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольным образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных

помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– 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 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание с частотой 600-800 об/мин и температуре 37 ± 1 °С;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

– 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;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– флаконы вместимостью 15 мл;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать сыворотку крови.

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

6.3. Образцы сыворотки 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.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа вскрыть упаковку набора, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Выдержать все компоненты и анализируемые образцы сывороток крови при температуре от 18 до 25°C не менее 30 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение срока годности набора.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка, установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с осушителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Промывочный раствор приготовить разведением концентрата фосфатно-солевого буферного раствора в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

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

Хранение: при температуре от 2 до 8 °C не более 5 суток.

7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца.

Калибровочные и контрольный образцы готовы для использования и не требуют дополнительного разведения.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Готовится за 5-10 мин до начала анализа!

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в чистый флакон или ванночку для реагента внести необходимое количество РРК, добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре от 18 до 25 °C не более 3 ч.

Таблица расхода компонентов.

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл	Конъюгат, концентрат, мл	РРК, мл	
2	4,0	до 100	0,2	2,0	2,0
3	6,0	до 150	0,3	3,0	3,0
4	8,0	до 200	0,4	4,0	4,0
5	10,0	до 250	0,5	5,0	5,0
6	12,0	до 300	0,6	6,0	6,0
7	14,0	до 350	0,7	7,0	7,0
8	16,0	до 400	0,8	8,0	8,0
9	18,0	до 450	0,9	9,0	9,0
10	20,0	до 500	1,0	10,0	10,0
11	22,0	до 550	1,1	11,0	11,0
12	24,0	до 600	1,2	12,0	12,0

7.6. Подготовка раствора ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс готов для использования.

Исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ плюс. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в чистый флакон или ванночку для реагента.

Утилизировать раствор ТМБ плюс, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ плюс необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ плюс, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ плюс в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.7. Стоп-реагент готов для использования.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 50 мкл каждого калибровочного образца и по 50 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 50 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см. п. 7.5.).

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать флакон или ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора

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

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл промывочного раствора в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.6.).

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

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37 ± 1 °C.

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

8.6. 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-655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации T_4 обш в калибровочных образцах (нмоль/л).

9.3. Определить содержание T_4 общ в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.4. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации T_4 общ в контрольном образце соответствует диапазону концентраций, указанному на этикетке флакона.

9.5. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации T_4 общ в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

9.6. Для предоставления результатов измерений концентрации T_4 общ в нг/мл, следует использовать коэффициент пересчета 0,775 ($1 \text{ нг/мл} = 0,775 \text{ нмоль/л}$).

Примечание: наличие в образцах сыворотки крови свободного гемоглобина в концентрации до 1,4 г/л; билирубина в концентрации до 1,8 мг/дл и триглицеридов в концентрации до 3,2 г/л не оказывает интерферирующего влияния на результаты иммуноферментного определения концентрации общего тироксина.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора. В случае дробного использования:

- неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;
- калибровочные образцы; контрольный образец; конъюгат, концентрат; концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином; раствор для разведения конъюгата; раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;
- промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток;
- рабочий раствор конъюгата хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч;

10.5. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации общего Т₄ в контрольном образце.

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

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

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 «Т₄ общий-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 227-67-64, 363-23-77.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

КРАТКАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИФА ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

«Т4 общий-ИФА-БЕСТ»

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести:	по 50 мкл калибровочных и контрольного образцов в дублях;
	по 50 мкл анализируемых образцов в дублях.
Внести:	по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.
Инкубировать:	60 мин, 37°C, 650 об/мин.
Промыть:	промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
Внести:	по 100 мкл раствора ТМБ плюс.
Инкубировать:	15 мин, 37°C, 650 об/мин, в темноте.
Внести:	по 100 мкл стоп-реактанта.
Измерить:	ОП при 450 нм / референсная длина волны 620-655 нм.

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

Символ	Описание	Символ	Описание
	Номер по каталогу		Осторожно!
	Содержимого достаточно для проведения n тестов		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Код партии		Предел температуры
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до		Обратитесь к инструкции по применению
YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате: Год-Месяц-День Год-Месяц		

Научный сотрудник лаборатории ИФА гормонов
и опухолевых маркеров НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

Начальник лаборатории ИФА гормонов
и опухолевых маркеров НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

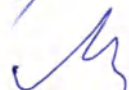
Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



А.Р. Молчанова



С.В. Шеметов



М.Ю. Рукавишников

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.

Директор по технологии и качеству
АО «Вектор-Бест»



Масяго А.В.
«20» 11 20 23 г.