

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ 200 г. № _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для количественного определения

тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови человека

методом иммуноферментного анализа

(ИФА-ТТГ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор ИФА-ТТГ предназначен для количественного определения концентрации тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 исследуемых образцов, 7 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 96 определений.

1.3. ТТГ – гормон гликопротеиновой природы, продуцируемый передней долей гипофиза, секреция которого стимулируется тиролиберином, синтезируемым клетками гипоталамуса. ТТГ действует, главным образом, на щитовидную железу, стимулируя синтез тироксина и трийодтиронина и выделение их в кровь. Под влиянием ТТГ тиреоглобулин переходит в фолликулярные клетки щитовидной железы, затем гидролизруется протеолитическими ферментами с образованием тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3). Выброс ТТГ регулируется циркулирующими в крови свободными фракциями гормонов щитовидной железы. Уровень ТТГ в крови снижается при высоких концентрациях свободных фракций гормонов щитовидной железы в периферической крови и, наоборот, повышается при низких концентрациях свободных фракций тиреогормонов.

1.4. Определение концентрации ТТГ в периферической крови имеет важное значение для диагностики заболеваний щитовидной железы и при оценке функционального состояния гипоталамо-гипофизарной системы. Особое значение определение уровня ТТГ имеет при диагностике гипотиреоза, гипертиреоза и при терапевтическом мониторинге больных гипотиреозом, ежедневно получающих заместительную терапию тироксином.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на одностадийном “сэндвич” варианте твердофазного иммуноферментного анализа. Лунки планшета сорбированы стрептавидином. При одновременном внесении в лунку образца сыворотки крови и конъюгата, состоящего из биотинилированных мышинных моноклональных антител против ТТГ и конъюгированных с пероксидазой хрена козьих поликлональных антител против ТТГ, происходит связывание биотинилированных антител со стрептавидином на планшете, с одной стороны, и специфическое взаимодействие с ТТГ, присутствующем в образце сыворотки, с другой. С иммобилизованным таким образом ТТГ через другой антигенный эпитоп связываются козы антитела, меченые пероксидазой. Не связавшиеся реагенты удаляются в процессе отмывки, а образовавшийся иммунный комплекс выявляется ферментативной реакцией при добавлении субстрата (ТМБ). Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию ТТГ в пробе. Концентрацию ТТГ в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания ТТГ в калибровочных пробах.

3. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты:

- планшет 96-луночный полистироловый стрипованный, сорбированный стрептавидином, готовый для использования - 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по Второму международному стандарту ТТГ человека IRP 80/558, содержащие известные количества ТТГ: 0 мМЕ/л - 1 пробирка (1,1 мл); 0,2; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 20 мМЕ/л; концентрации ТТГ в калибровочных пробах могут незначительно изменяться от указанных величин, точные значения указаны на этикетках пробирок, готовые для использования – 7 пробирок (по 0,8 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ТТГ, готовая для использования - 1 пробирка (0,6 мл);
- конъюгат, состоящий из козьих поликлональных антител против ТТГ, меченых пероксидазой из корня хрена, и биотинилированных мышинных моноклональных антител против ТТГ, готовый для использования - 1 флакон (13 мл);
- отмывочный раствор: фосфатно-солевой буферный раствор с 0,05% твин-20, рН 7,2-7,4, 20-кратный концентрат – 1 флакон (50 мл);

- раствор хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), 11-кратный концентрат – 1 пробирка (1,5 мл);
- субстратный буфер, содержащий перекись водорода – 1 флакон (15 мл);
- стоп-реагент (кислота серная, 1 М), готовый для использования – 1 флакон (15 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Перекрестная реактивность антител к ТТГ при высоких уровнях (1000 нг/мл) лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) приведена в таблице.

Гормон	Процент перекрестной реактивности
ТТГ	100%
ФСГ	<0,01%
ХГЧ	<0,01%
ЛГ	<0,01%

4.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ТТГ не превышает 0,078 мМЕ/л.

4.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания ТТГ в одном и том же образце сыворотки крови не превышает 8 %.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ТТГ - соответствие измеренной концентрации ТТГ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0,5 мМЕ/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

4.5. Линейность. Зависимость концентрации ТТГ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ТТГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0 – 20 мМЕ/л и составляет $\pm 10\%$.

4.6. Клиническая проверка. Концентрация ТТГ, измеренная в сыворотке крови у 50 здоровых лиц в возрасте 18-45 лет, составляла 0,23 – 3,8 мМЕ/л

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора ИФА-ТТГ уточнить значения концентраций ТТГ, соответствующие нормальным для обследуемого контингента.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

5.2 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3 Стоп-реагент (серная кислота) действует на кожу и слизистые прижигающим образом, вызывая раздражение и ожоги, поэтому в случае попадания на кожные или слизистые покровы ее следует немедленно и тщательно смыть большим количеством проточной воды.

5.4 Тетраметилбензидин (ТМБ), субстратный буфер и рабочий раствор ТМБ чувствительны к воздействию солнечного света; необходимо также исключить их контакт с окислителями и металлами.

5.5 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.).

5.6 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита и другие возбудители вирусных инфекций.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостат или планшетный шейкер-термостат, позволяющие поддерживать температуру 18-25 °С (в случае, если температура в помещении выходит за эти пределы);
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 30 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 100-300 мкл;
- мерная посуда вместимостью 100 и 1000 мл;
- секундомер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;

- вода дистиллированная.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови человека.

До проведения анализа возможно хранение образцов сыворотки крови при температуре $+(2 - 8)^{\circ}\text{C}$ не более 2 дней или при температуре $- 20^{\circ}\text{C}$ (и ниже) не более 3 месяцев. Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов сыворотки крови.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

8.1. Приготовление рабочего отмывочного раствора.

Концентрат отмывочного раствора развести дистиллированной водой в 20 раз. Срок хранения рабочего раствора при температуре $+(2 - 8)^{\circ}\text{C}$ – не более 1 месяца.

Для анализа четырех стрипов: 16 мл концентрата отмывочного раствора довести до 320 мл дистиллированной водой.

8.2. Приготовление рабочего раствора ТМБ.

8.3. Концентрат ТМБ развести субстратным буфером в 11 раз. (ВНИМАНИЕ: при разведении необходимо к субстратному буферу добавить ТМБ, а не наоборот). Готовится непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

Для анализа четырех стрипов: 0,4 мл концентрата ТМБ смешать с 4 мл субстратного буфера.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Выдержать компоненты набора и анализируемые образцы крови при комнатной температуре $+(18-25)^{\circ}\text{C}$ в течение времени не менее 30 минут. Пакет с планшетом не открывать! Встряхнуть все компоненты набора.

9.2. Извлечь планшет из пакета. Определить необходимое количество лунок (количество образцов + 7 калибровочных проб + 1 контрольная сыворотка + Blank) x 2 и поместить стрипы в рамку. Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить обратно в пакет и плотно закрыть (пакетик с осушителем должен оставаться внутри). Хранить при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ не более 3 месяцев.

9.3. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы (начиная с минимальной концентрации), контрольной сыворотки и анализируемых образцов сыворотки крови.

9.4. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата. Конъюгат вносить в лунки планшета в той же последовательности, что и калибровочные пробы, контрольную сыворотку и исследуемые образцы. Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки, анализируемых образцов и конъюгата не должно превышать 10 минут.

9.5. Заклеить планшет липкой лентой. Осторожно перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 10-15 секунд и инкубировать в течение 60 минут при комнатной температуре (+18–25° С).

9.6. Содержимое лунок удалить декантированием и затем промыть лунки планшета 5 раз рабочим отмывочным раствором (см п. 8.1), внося в каждую лунку по 300 мкл. Удалить остатки раствора постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.7 Внести во все лунки, кроме Blank, по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см п. 8.2.) в той же последовательности, что и конъюгат.

9.8 Инкубировать планшет в темном месте при комнатной температуре в течение 20-25 минут, в зависимости от степени развития окраски.

9.9 Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента. Тщательно перемешать содержимое лунок круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 10-15 секунд.

9.10. Провести измерение величины оптической плотности в лунках планшета на фотометре при длине волны 450 нм. Процедура измерения не должна превышать 15 минут (до измерения хранить планшет в защищенном от света месте).

10. РАСЧЕТЫ

10.1. Рассчитать средние арифметические значения показателей оптической плотности (ОП) калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов сыворотки крови (вычесть из показателей значение ОП в лунках, предназначенных для Blank).

10.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ось Y) от концентрации ТТГ в калибровочных пробах (ось X).

10.3. При построении калибровочного графика и определении концентрации ТТГ в исследуемых образцах с помощью автоматического анализатора иммуноферментных реакций рекомендуется использовать кусочно-линейный метод аппроксимации.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.

11.1. Набор реагентов ИФА-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 3 суток. Замораживание компонентов не допускается.

11.2. Срок годности набора – 1 год.

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

- вскрытый планшет можно хранить в плотно закрытом пакете с осушителем при температуре $+(2-8)^{\circ}\text{C}$ не более 3 месяцев;
- калибровочные пробы, контрольную сыворотку, конъюгат, концентрат ТМБ, субстратный буфер после вскрытия флаконов можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 2 месяцев;
- рабочий отмывочный раствор можно хранить в закрытой емкости при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;
- рабочий раствор ТМБ хранению не подлежит;
- стоп-реагент можно хранить в закрытой емкости при комнатной температуре $+(18-25)^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

11.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме того, рекомендуется определение ТТГ в контрольной сыворотке.

11.5. Если концентрация ТТГ в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 20 мМЕ/л, образец следует развести калибровочной пробой 0 мМЕ/л, повторить анализ и полученный результат умножить на фактор разведения

11.6. Не допускается использование раствора ТМБ и стоп-реагента из наборов других фирм-производителей.

11.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1 стр.3, телефон/факс: (495) 246-45-01, или (e.mail) info@lytech.ru или в ФГУ НЦЭСМП МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14 а, тел: (495)120-60-95; 120-60-96.

Директор ООО НПФ «Литех»

ГОВОРУН Т.Л.

