УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от_____2010 г.
№_____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ХЕМА»
_____ Ю. С. Лебедин
11 января 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

«T_4-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «T_4-ИФА» предназначен для ин витро определения тироксина в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тироксин (T_4) и 3,5,3 -трийодтиронин (Тз) — 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 свободныеТз и T_4, однако их доля очень мала: 0,03 %от общего содержания для T_4 и 0,394 - для Тз Концентрация T_4 в сыворотке крови — наиболее общепринятый показатель функции щитовидной железы, позволяющий довольно четко разграничивать гипер-, гипо- и эутиреоз.

Повышение содержания общего T_4 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 T_4 наблюдается при гипотериозе, пангипопитуитаризме, состояниях с пониженным уровнем ТСГ (акромегалия, нефротический синдром, гипопротеинемия, хронические заболевания печени, андрогенсекретирующие опухоли или прием андрогенов, генетически обусловленное снижение), гемолизе, физической нагрузке, при приеме аминосалициловой и ацетилсалициловой кислот, глюкокортикоидов, сульфаниламидов, холестирамина, резерпина, йодида калия, трийодтиронина.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение T_4 в сыворотке (плазме) крови в клинической практике используется обычно для клинической лабораторной диагностики патологий щитовидной железы различной этиологии.

КОПИЯ ВЕРНА

1.4. Область применения —клиническая лабораторная диагностика.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение T_4 основано на использовании конкурентного варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышиные моноклональные анти-Т4 антитела. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит конкурентное связывание T_4, содержащегося в образце, и Т4, конъюгированного с пероксидазой (конъюгат), с антителами на твердой фазе.

Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации T_4 в исследуемом образце. Концентрацию T_4в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания T_4 в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- планшет 96-луночный полистироловый стрипированный с сорбированными на внутренней поверхности лунок мышиными моноклональными анти-Т4 антителами; готов к использованию - 1 шт.

- калибовочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества Т4 — 0; 32; 64; 160 и 320 нмоль/л; концентрации T_4 в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (по 0,8 мл каждая);

- конъюгат; готов к использованию - 1 флакон (14,0 мл);

- раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ); готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием Тт, готова к использованию - пробирка или флакон (0,8 мл);

- концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой) 26х-кратный -1 флакон (22 мл);

- стоп-реагент; готов к использованию - флакон (14 мл);

- липкая лента с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;

-Инструкция по применению Набора реагентов «Т4-ИФА»;

- Паспорт контроля качества Набора реагентов «Т4-ИФА».

КОПИЯ ВЕРНА

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к T_4 с другими аналитами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестнаяреакция%
L-тироксин	100
D-тироксин	30
Тз	0.5

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «T_4-ИФА» концентрация T_4 в сыворотке (плазме) крови не превышает 3,0 нмоль/л.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания T_4в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «Т4-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» T_4 соответствие измеренной концентрации T_4 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 64 нмоль/л .

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации T_4 в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей T_4, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 32-320 нмоль/л и составляет - 10,0%.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Единицы		Дополнительные единицы	
	нмоль/л		нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	60	160	4.7	12.4
мужчины				
старше 61 года	60	129	4,7	10,0
женщины				
старше 61 года	70	13 5	5,4	10,5
дети				
1-5 лет	90	190	7,0	14,7
6-10 лет	83	1 70	6,4	13, 2
>10 лет	60	160	4,7	12,4

В соответствии с требованиями GLP (Good Laboratory Practice, Хорошая ЛабораторнаяПрактика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «T_4-ИФА» уточнить значения концентрации T_4, 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 «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. 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 25-250 мкл;

- термостат, поддерживающий температуру +37+0,1 °с;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- цилиндр мерный вместимостью 1000 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 °с) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 °с не более 24 ч или при температуре минус 20 °с 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. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °с. Повторное замораживание-опаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

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

6.5. При использовании Набора реагентов «T_4-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения

6.6. необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации Т4 в контрольной сыворотке.

6.7. 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 °с в течение всего срока годности Набора.

6.8. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл) перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

КОПИЯ ВЕРНА

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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18…25 °с) не более 2 сут. или при температуре +2-8 °с не более 10 сут.

6.9. Приготовление конъюгата.

Смешать непосредственно перед внесением конъюгата в лунки планшета равные объемы концентрата конъюгата и Буфера для разведения концентрата конъюгата.

Тщательно перемешать полученный раствор, избегая вспенивания. Полученный конъюгат хранению не подлежит.

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.

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

7.3. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 60 мин при температуре +37 0,1 °с .

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 1-2 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °с) в течение 1525 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.

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

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В случае невозможности своевременного измерения ОП растворов в лунках на фотометре, планшет допускается хранить при температуре +2-8 °с не более 4 ч.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. **Построить** в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось **абцисс**

(х) — десятичный логарифм концентрации ТА в калибровочных пробах (нмоль/л), ось ординат (у) — оптическая плотность калибровочных проб (ОП450). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика использовать интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравнивать концентрацию T_4 в калибровочной пробе 0 нмоль/л к несущественно малой величине, например 0,001 нмоль/Л.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание T_4 в исследуемых образцах.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «T_4-ИФА» должен храниться в упаковке предприятияизготовителя при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности (18 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °с не более 15 сут.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных образцов, 5 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:

-оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

-все остальные компоненты Набора после вскрытия флаконов следует хранить при температуре + 2…+8^0 С в течение всего срока годности Набора;

-оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре + 2…+8^0 С в течение всего срока годности Набора;

-приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 °с) не более 15 сут. или при температуре +2-8 °С не более 45 сут.;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «T_4-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
11 января 2010 г.

М.П. ХЕМА

«СОГЛАСОВАНО»
Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздрава _____ д.м.н., профессор В. В. Долгов

М.П.

Подпись
удостоверяю:
кадровой работ
РМАПО Росздр
подпись: _____

КОПИЯ ВЕРНА

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись _____
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru