УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от_____2011 г.
№_____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ХЕМА»
_____Ю. С. Лебедин
11 января 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

«свТ3-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «свТ3-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации свободного трийодтиронина в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализ.

1.2. Тироксин (Т4) и 3,5,3 -трийодтиронин (Т3) — 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 свободные формы Т3 и Т4, однако их доля очень мала: 0,03 % от общего содержания для Т4 и 0,3 % - для Т3. Концентрация Т3 ниже, чем Т4, однако его метаболическая активность примерно в 3 раза выше. Около 80% сывороточного Т3 образуется за счет дейодирования Т4 в периферических тканях, и только небольшое его количество образуется прямым синтезом в щитовидной железе. Поэтому при гипотиреозе уровень Т3 может длительное время находиться на нижнем пределе нормы, так как его потеря может компенсироваться повышенным превращением Т4 в Т3 Показаниями к определению общего и свободного Т3 служит начальная стадия гиперфункции щитовидной железы; дифференциальная диагностика гипертиреоза; рецидив гипертиреоза; симптоматическое повышение уровня Т3; острый гипертиреоз после подавляющей терапии L-тироксином.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение свТ3 в сыворотке (плазме) крови используется обычно для клинической лабораторной диагностики патологий щитовидной железы различной этиологии

1.4. Область применения - клиническая лабораторная диагностика

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение свободного трийодтиронина основано на использовании конкурентного варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к Т3. Свободный трийодтиронин из образца конкурирует с конъюгированным Т3 за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу.

Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации свТ3 в исследуемом образце. Концентрацию свТ3 в исследуемых образцах определяют по калибровочному

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

графику зависимости оптической плотности от содержания свТз в калибровочных пробах. 2.2. Состав Набора:

планшет 96-луночный полистироловый,стрипированный с иммобилизированными на внутренней поверхности лунок кроличьими поликлональными антителами; готов к использованию - 1 шт.;

калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества свободного трийодтиронина — 0; 2,5; 5; 10; 20 и 40 пмоль/л; концентрации свТз в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 6 пробирок или флаконod(по 0,8 мл каждая);

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

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

контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием свТз; готова к использованию - 1 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 «свТ3-ИФА»
- Паспорт контроля качества Набора реагентов «свТ3-ИФА»

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность Перекрестная реакция кроличьих поликлональныгх антител к Тз с другими аналитами приведена в Таблице.

Аналит	Перекрестнаяреакция%
L-Тз	100
D-Тз	100
L-тироксин	0,01
D-тироксин	0,04

3.2. Чувствительность Минимальная достоверно определяемая Набором реагентов «свТз-ИФА» концентрация свТз в сыворотке (плазме) крови не превышает 0,5 пмоль/л.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания свТз в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «свТз-ИФА» не превышает 8,094.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» соответствие измеренной концентрации свТз предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5 пмоль/л

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации свТз в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей свТз, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 2,5-40 пмоль/л и составляет - 10,0%.

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

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	Единицы	
	пмоль/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	2,5	5,8
Беременные:		
1-йтриместр	2,0	3,7
2-йтриместр	1,9	3,3
3-йтриместр	1,9	3,3

В соответствии с требованиями GLP (GoodLaboratoryPractice, Хорошая ЛабораторнаяПрактика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «свТз-ИФА» уточнить значения концентрации свТз, 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;
- 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.

КОПИЯ ВЕРНА

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

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

6.5. При использовании Набора реагентов «свТз-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации свТз в контрольной сыворотке.

6.6. 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.

6,7. Приготовление отмывочного раствора.

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

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (106ъем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

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.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 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 50 мклконъюгата.

7.3. Заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 60 мин при температуре +37 °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 илидекантированием. 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 2-3мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °с) в течение 1020 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

КОПИЯ ВЕРНА

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

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.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абцисс (x) — десятичный логарифм концентрации свТз в калибровочных пробах (пмоль/л), ось ординат

(y) — оптическая плотность калибровочных проб (011450). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика использовать интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию свТз в калибровочной пробе 0 пмоль/л к несущественно малой величине, например 0,001 пмоль/л.

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «свТз-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 5 сут.

Допускается однократное замораживание (-20^0 С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестных образцов, 6 калибровочных проб и 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;
- конъюгат, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре +2-8 °с не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20 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.;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

КОПИЯ ВЕРНА

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

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «свТз-ИОА», 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 2011 г. М.П.

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

Подпись В.В. Долгова
Заверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
Карасева О.Н.

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