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 трийодтиронина в сыворотке (плазме) крови

«Тз-ИФА»

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ.

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

1.2. Трийодтиронин (Тз) — гормон с молекулярной массой 651 дальтон, 58% которого составляет йод. 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 свободные формы Тз и $T_4$, однако их доля очень мала: 0,03% от общего содержания для $T_4$ и 0,394 - для Тз. Концентрация Тз ниже, чем $T_4$, однако его метаболическая активность примерно в 3 раза выше. Около 8094 сывороточного Тз образуется за счет дейодирования$T_4$ в периферических тканях, и только небольшое его количество образуется прямым синтезом в щитовидной железе. Поэтому при гипотиреозе уровень Тз может длительное время находиться на нижнем пределе нормы, так как его потеря может компенсироваться повышенным превращением $T_4$ в Тз. Показаниями к определению общего Тз служит начальная стадия гиперфункции щитовидной железы; дифференциальная диагностика гипертиреоза; рецидив гипертиреоза; острый гипертиреоз после лечения L-тироксином. Количественное определение общего Тз особенно информативно при Тз-тиреотоксикозе, т.к. у 5-10 % больных уровень $T_4$ существенно не изменяется, а концентрация Тз резко увеличивается.

При гипотиреозе диагностическая ценность Тз невелика, т.к. часто при клинических признаках гипотиреоза показатели Тз остаются в норме. Повышение уровня Тз наблюдается при ранней недостаточности функции щитовидной железы, приеме эстрогенов, пероральных контрацептивов, героина, метадона, эндемической зобе. При беременности уровень Тзвозрастает в несколько раз, а затем нормализуется после родов в течении нескольких дней. Снижение уровня Тз отмечается при гипофункциях щитовидной железы, остром и подостром тиреоидите, после приема андрогенов, дексаметазона, салицилатов, производных кумарина.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение Тз 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.

КОПИЯ ВЕРНА

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

2.1. Принцип работы Набора. Определение Тз основано на использовании конкурентного варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы кроличьи политональные анти-Тз-антитела. В лункахпланшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит конкурентное связывание Тз, содержащегося в образце, и Тз, 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 Тз в исследуемом образце. Концентрацию Тз в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания Тз в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

планшет 96-луночный полистироловый стрипированный с сорбированными на внутренней поверхности лунок кроличьими поликлональными анти-Тз антителами; готов к использованию –1 шт.;

калибровочные пробы на основе трис-буфера (рн 7.2-7.4), содержащие известные количества Тз — 0; 0,75; 1,5; 7,5 и 15 нмоль/л; концентрации Тз 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);

концентрат конъюгата; готов к использованию - флакон (7 мл);

Буфер для разведения концентрата конъюгата ; готов к использованию - 1 флакон (7 мл);

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

контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием Тз; 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 - 1 флакон (14 мл);

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

Инструкция по применению Набора реагентов «Т3-ИФА»- 1шт;

Паспорт качества Набора реагентов «Т3-ИФА».

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность Перекрестная реакция кроличьих поликлональных 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 «Тз-ИФА» концентрация Тз в сыворотке (плазме) крови не превышает 0,2 нмоль/л.

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

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания Тз в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «Тз-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» Тз соответствие измеренной концентрации Тз предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 1,5 нмоль/л

Процент «открытия» составляет 90-110%

3.5. Линейность. Зависимость концентрации Тз в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей Тз, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,75-15 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 | - | 3,2 | - | |

В соответствии с требованиями GLP (GoodLaboratoryPractice, Хорошая ЛабораторнаяПрактика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «Тз-ИФА» уточнить значения концентрации Тз, 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 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

КОПИЯ ВЕРНА

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

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.

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 «Тз-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 Тз 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 (1 объем 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.

6.8. 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 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.

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

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

7.3. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 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 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.

8.1. 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 не позднее 5 мин после внесения стоп-реагента.

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) — логарифм концентрации Тз 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. Приравняйте концентрацию Тз в калибровочной пробе 0 нмоль/л к несущественно малой величине, например 0,001 нмоль/л.

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

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «Тз-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя 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.

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

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;
- конъюгат хранению не подлежит;
- раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) после вскрытия флаконов допускается хранить при температуре +2-8 °с не более мес.;
- концентрат конъюгата, Буфер для разведения концентрата конъюгата и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить 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 Инструкции по применению Набора.

**По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «Тз-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 Росзд
подпись: _____

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