

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Руководитель Департамента  
государственного контроля  
лекарственных средств и  
медицинской техники МЗ РФ  
\_\_\_\_\_ В.Е. Акимочкин  
«25» марта 2003 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ  
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
**СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА**  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ  
**(ТироидИФА-свободный T<sub>4</sub>)**

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа Комитета по  
новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 9 от 21 октября 2002 г.)

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов ТироидИФА-свободныйT<sub>4</sub> предназначен для количественного определения содержания свободного тироксина (T<sub>4</sub>) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Тироксин — тироидный гормон с молекулярной массой 777 Да. Тироксин является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. Количественное определение уровня тироксина в крови имеет диагностическое значение при оценке функционального состояния щитовидной железы. В сыворотке крови тироксин в основном находится в связанном состоянии. Основными тироксин-связывающими белками сыворотки являются: тироксин-связывающий глобулин (ТСГ), тироксин-связывающий преальбумин (ТСПА) и альбумин. Концентрация гормона, не связанного с белками (свободныйT<sub>4</sub>), очень мала — приблизительно 0,03% от концентрации общего циркулирующего гормона. Считается, что биологически активным является именно свободный гормон.

Концентрация свободногоT<sub>4</sub> не зависит от уровня связывающих белков и остается в пределах нормы как при повышенных (врожденная патология, беременность, использование оральных эстрогенов и контрацептивов), так и при пониженных уровнях ТСГ (врожденная патология, использование андрогенов или салицилатов, почечная недостаточность), а также в случае понижения связывающей способности белков (использование салицилатов). Таким образом, уровень свободногоT<sub>4</sub> отражает истинный тироидный статус. Его концентрация превышает уровень нормы при гиперфункции щитовидной железы или в результате употреблении препаратов, содержащих тироксин. Уровень свободного T<sub>4</sub> находится ниже нормы при гипофункции щитовидной железы.

**1.3.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40неизвестных, бкалибровочных проб, одной контрольной проб и одной пробы для определения оптической плотности раствора тетраметилбензидина при использовании всех стрипов одновременно.

**Примечание:** В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

## **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

Принцип работы набора состоит в следующем. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата тироксин-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и свободным  $T_4$  сыворотки крови за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами конъюгата тироксин-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству свободного  $T_4$  в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата тироксин-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного  $T_4$  в исследуемых образцах.

### 3. СОСТАВ НАБОРА:

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к тироксину, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к тироксину» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества свободного  $T_4$ ; значения концентраций свободного  $T_4$  в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат тироксина с пероксидазой, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» (1Н соляная кислота) — 1 флакон (14мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотке крови человека с известным содержанием свободного  $T_4$ , маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл).

### 4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к тироксину с другими тироидами приведена в таблице.

Таблица

ТИРОИД	Перекрестная реакция, %
L-Тироксин	100,0
L-Трийодтиронин L-Дийодтирозин	8,0 0,001

4.2. Коэффициент вариации результатов определения свободного  $T_4$  в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ТироидИФА-свободный  $T_4$  не превышает 8%.

**4.3.** Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация свободного  $T_4$  в сыворотке крови человека не превышает 1,0 пмоль/л.

**4.4.** Клиническая проверка. Содержание свободного  $T_4$  измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 200 здоровых лиц в возрасте 18–45 лет. Диапазон измеренных концентраций составил 10,0–23,2 пмоль/л. Этот диапазон может быть использован в качестве ориентировочного показателя нормы.

**4.5.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций свободного  $T_4$ , соответствующие нормальным.

## **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**5.1.** Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

**5.2.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

**5.3.** 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.).

**5.4.** Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

**5.5.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

**5.6.** Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

**5.7.** Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

## **6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:**

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре + 37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 200 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 300 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

### **7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.**

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к пробкам. Открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5мл дистиллированной воды и закрыть пробки. Выдержать флаконы в течение 10минут при комнатной температуре (+18...25°C). Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10минут выдержать флаконы при комнатной температуре (+18...25°C), периодически перемешивая.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

**7.2. Стрипы.** Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.3. Промывочныйбуфер.** Необходимое количество БуфераР развести дистиллированной водой в 10раз. Например:

5мл БуфераР + 45мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.4. Конъюгат Е** готов к использованию.

**7.5. Раствор ТМБ** готов к использованию.

**7.6. Стоп-реагент** готов к использованию.

## **8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**8.1.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры. На последней странице приведена схема проведения анализа.

**8.2.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;  
B1, B2 — №2 для калибровочной пробы №1;  
C1, C2 — №3 для калибровочной пробы №2;  
D1, D2 — №4 для калибровочной пробы №3;  
E1, E2 — №5 для калибровочной пробы №4;  
F1, F2 — №6 для калибровочной пробы №5;  
G1, G2 — №7 для калибровочной пробы №6;  
H1, H2 — №8 для контрольной сыворотки.

**8.3.** Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки в дубликатах.

**8.4.** Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 150 мкл конъюгата E.

**8.5.** Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 1 часа в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

**8.6.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.3, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

**8.7.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

**8.8.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минуты.

**8.9.** Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов необходимо использовать формулу  $V/V_0 \times 100\%$  для каждой калибровочной или исследуемой пробы, где V — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,  $V_0$  — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу 0 пмоль/л. В координатах «Logit-log» построить калибровочный график зависимости  $V/V_0 \times 100\%$  от концентрации свободного  $T_4$  в калибровочных пробах (пмоль/л).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой  $(V - V_T) / (V_0 - V_T) \times 100\%$ , где  $V_T$  — среднее арифметическое значение оптической плотности лунок A1 и A2.

Определить содержание свободного  $T_4$  в пробах по калибровочному графику.

**8.10.** Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п.8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более **20 минут** при температуре +2...8°C.

## **9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

**9.1.** Набор ТироидИФА-свободныйТ<sub>4</sub> должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5суток. Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8° в течение всего срока годности;
- конъюгат Е и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более одного месяца при температуре +2...8°C;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5суток при комнатной температуре (+18...25°C);
- БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2..8°C в течение всего срока годности.

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

**9.3.** При вскрытии и растворении лиофилизированных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

**9.4.** Пробы сыворотки крови хранить при температуре +2...8°C не более 2дней; при необходимости более длительного хранения — при температуре –20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

**9.5.** При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации свободного Т<sub>4</sub> в контрольной сыворотке.

**9.6.** Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

**9.7.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

**По вопросам качества набора «ТироидИФА-свободныйТ<sub>4</sub>» обращаться по адресу: 189650, г.Санкт-Петербург, п.Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 596-67-80, или в ИГКЛС ФГУ «НЦ ЭСМП» МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14 А, тел. (095) 120-60-95.**

## **СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48	

КП № 1, мкл	—	20	—	—	—	—	—	—	—
КП № 2, мкл	—	—	20	—	—	—	—	—	—
КП № 3, мкл	—	—	—	20	—	—	—	—	—
КП № 4, мкл	—	—	—	—	20	—	—	—	—
КП № 5, мкл	—	—	—	—	—	20	—	—	—
КП № 6, мкл	—	—	—	—	—	—	20	—	—
КС, мкл	—	—	—	—	—	—	—	20	—
С <sub>х</sub> , мкл	—	—	—	—	—	—	—	—	20
Конъюгат тироксин-пероксидаза, мкл	—	150	150	150	150	150	150	150	150
Инкубация № 1	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
4-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300	4х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 2	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Спектрофотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

**Примечания:**

*КП — калибровочная проба;*

*КС — контрольная сыворотка;*

*С<sub>х</sub> — анализируемые пробы;*

*ОП — оптическая плотность;*

*КТ — комнатная температура (+18...25°C).*

---

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Алкор Био»:  
зав. лабораторией биотехнологии В.А. Головаченко  
и ген. директором, к.б.н. Д.Г. Полынцевым