

«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора

от «13» июля 2011 г. № 4119-Пр/11

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СВОБОДНОГО ТРИЙОДТИРОНИНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
(«ТироидИФА-свободный Т₃»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТироидИФА-свободный Т₃» предназначен для количественного определения свободного трийодтиронина (Т₃) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Трийодтиронин (3,5,3'-трийодтиронин, Т₃) – тироидный гормон с молекулярной массой 651 Да. Трийодтиронин является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. Основная часть молекул трийодтиронина находится в связанной с белками плазмы форме. Доля свободного Т₃ составляет 0,2 – 0,5% от общего трийодтиронина. Именно свободный трийодтиронин обеспечивает весь спектр метаболической активности и осуществляет обратную связь с гипофизом. Его концентрация наиболее точно характери-

зует тиреоидный статус организма, так как в значительно меньшей степени, по сравнению с общим трийодтиронином, зависит от физиологического или патологического состояний организма (беременность, оральная контрацепция, стероидная терапия). Таким образом, уровень свободного T_3 отражает истинный тиреоидный статус.

Измерение концентрации свободного T_3 наиболее информативно в случаях T_3 -тиреотоксикоза, синдрома эутиреоидного больного, при генерализованной резистентности к тиреоидным гормонам, при классификации тиреотоксикозов по степени тяжести и мониторинге антитиреоидной терапии.

Уменьшение концентрации свободного T_3 может указывать на первичный, вторичный, третичный гипотиреозидизм. Однако в некоторых случаях снижение уровня свободного T_3 наблюдается также и при нетиреоидных заболеваниях – некомпенсированной первичной надпочечниковой недостаточности, тяжелых соматических и психических патологиях, в период выздоровления после тяжелых заболеваний, при низкокалорийной диете или диете с низким содержанием белка.

Повышенный уровень свободного T_3 наблюдается при тиреоидитах, синдроме резистентности к тиреоидным гормонам, ТТГ-независимом тиреотоксикозе, при тиреотропине и тиреотоксической аденоме, токсическом зобе, изолированном T_3 -токсикозе. Кроме того, повышение уровня свободного T_3 возможно при послеродовой дисфункции щитовидной железы, нефротическом синдроме, хронических заболеваниях печени, после гемодиализа.

1.3. Набор «ТиреоидИФА-свободный T_3 » рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки

и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ТироидИФА-свободный T_3 » использован вариант конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. При добавлении в лунки исследуемого образца и конъюгата T_3 -пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и свободным T_3 сыворотки крови в процессе связывания с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству свободного T_3 в исследуемом образце (Рисунок 1).

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации свободного T_3 в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного T_3 в исследуемых образцах.

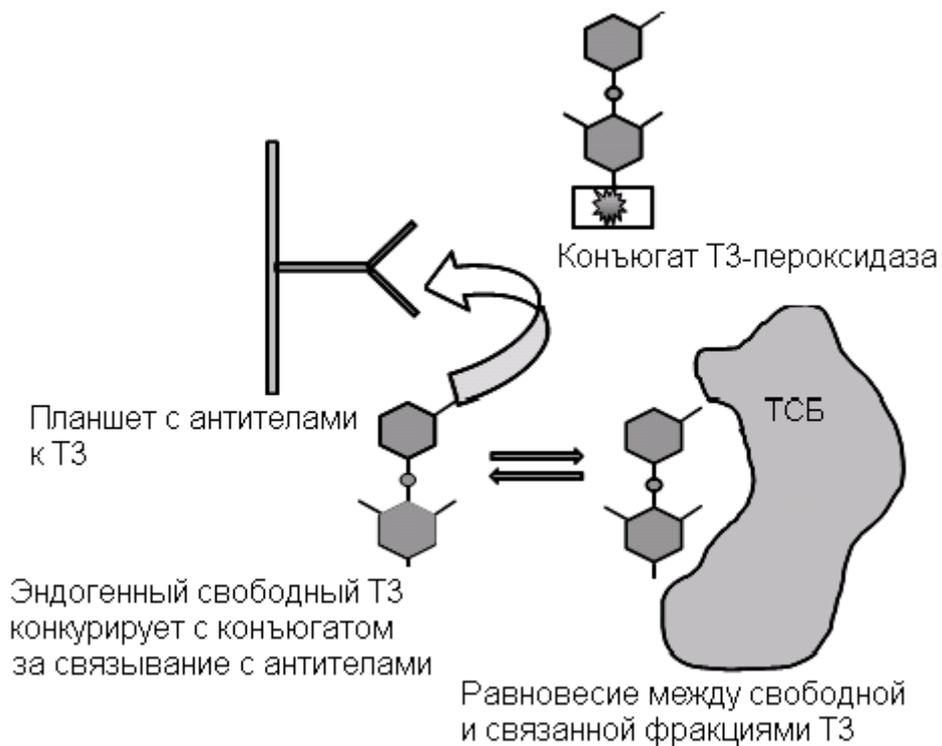


Рисунок 1. Схема анализа

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к трийодтирону, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к трийодтирону» — 1 упаковка;

- калибровочные пробы (КП), содержащие известные количества свободного Т₃. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций свободного Т₃ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 1,5; 3; 10; 20; 60 пмоль/л – 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);

- конъюгат Т₃-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» – 1 флакон (14 мл);

- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» – 1 флакон (12 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» – 2 флакона (по 14 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» – 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием свободного T_3 , маркирована «Контрольная сыворотка» – 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к трийодтиронину с другими тироидами приведена в Таблице 1.

Таблица 1

Тироид	Перекрестная реакция, %
T_3	100
L-Тироксин	< 0,1
D-Тироксин	< 0,1
r- T_3	< 0,1
Дийодотирозин	< 0,1

3.2. Коэффициент вариации результатов определения свободного T_3 в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «ТироидИФА-свободный T_3 » не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации свободного T_3 в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» свободного T_3 — проверка соответствия значения определяемой концентрации свободного T_3 расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №4. Процент открытия составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация свободного T_3 в анализируемом образце не превышает 0,5 пмоль/л.

3.6. Диапазон ожидаемых значений. Содержание свободного T_3 измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 200 здоровых лиц в возрасте 18–45 лет. Диапазон измеренных концентраций составил 2,5 – 7,5 пмоль/л.

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

Примечание: в наборе «ТиродИФА-свободный T_3 » значения концентраций калибровочных проб выражены в пмоль/л. Для перевода концентрации из пмоль/л в пг/мл необходимо значение концентрации, выраженное в пмоль/л, умножить на 0,651.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

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

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм и 405 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 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 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не разрешается использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сы-

вороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.4. Буфер А готов к использованию. Расход буфера А на один стрип составляет 1,0 мл.

7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.8. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

На странице 18 приведена схема проведения анализа.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – № 1 – для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 – для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 – для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 – для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 – для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 – для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 – для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 – для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по **80 мкл** буфера А.

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

***Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.4. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 45 минут в термостатируемом шейкере при температуре **+37°C** со скоростью **500-800 об/мин.**

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавлять по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. **7.1.5.**, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки, кроме лунок А1 и А2, по 100 мкл конъюгата.

7.2.7. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 15 минут **в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500-800 об/мин.**

7.2.8. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки согласно п. **7.2.5.**

7.2.9. 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 или 10 минут в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500-800 об/мин.

7.2.10. 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, перемешать на шейкере в течение 1-2 минут при комнатной температуре.

7.2.11. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. **7.2.10.**, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при комнатной температуре.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм. Если значение оптической плотности превышает предел линейного измерения спектрофотометра, считывание результатов проводят при 405 нм. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

***Примечание:** среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП при 450 нм.*

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации свободного T_3 (пмоль/л) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

***Примечание 1:** для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».*

***Примечание 2:** для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо пользоваться формулой 1 или 2.*

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов для каждой калибровочной или исследуемой пробы использовать формулу (1):

$$B/B_1 \times 100\%, \quad (1)$$

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то использовать формулу (2):

$$(B - B_T) / (B_1 - B_T) \times 100\%, \quad (2)$$

где B – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

B_1 – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу №1,

B_T — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

9.2. Определить содержание свободного T_3 в пробах по калибровочному графику.

9.3. Для образцов сыворотки крови со значениями оптической плотности выше оптической плотности нулевого калибратора (B_1) принимать значение концентрации «ниже 0,5 пмоль/л».

9.4. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации свободного T_3 , превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6».

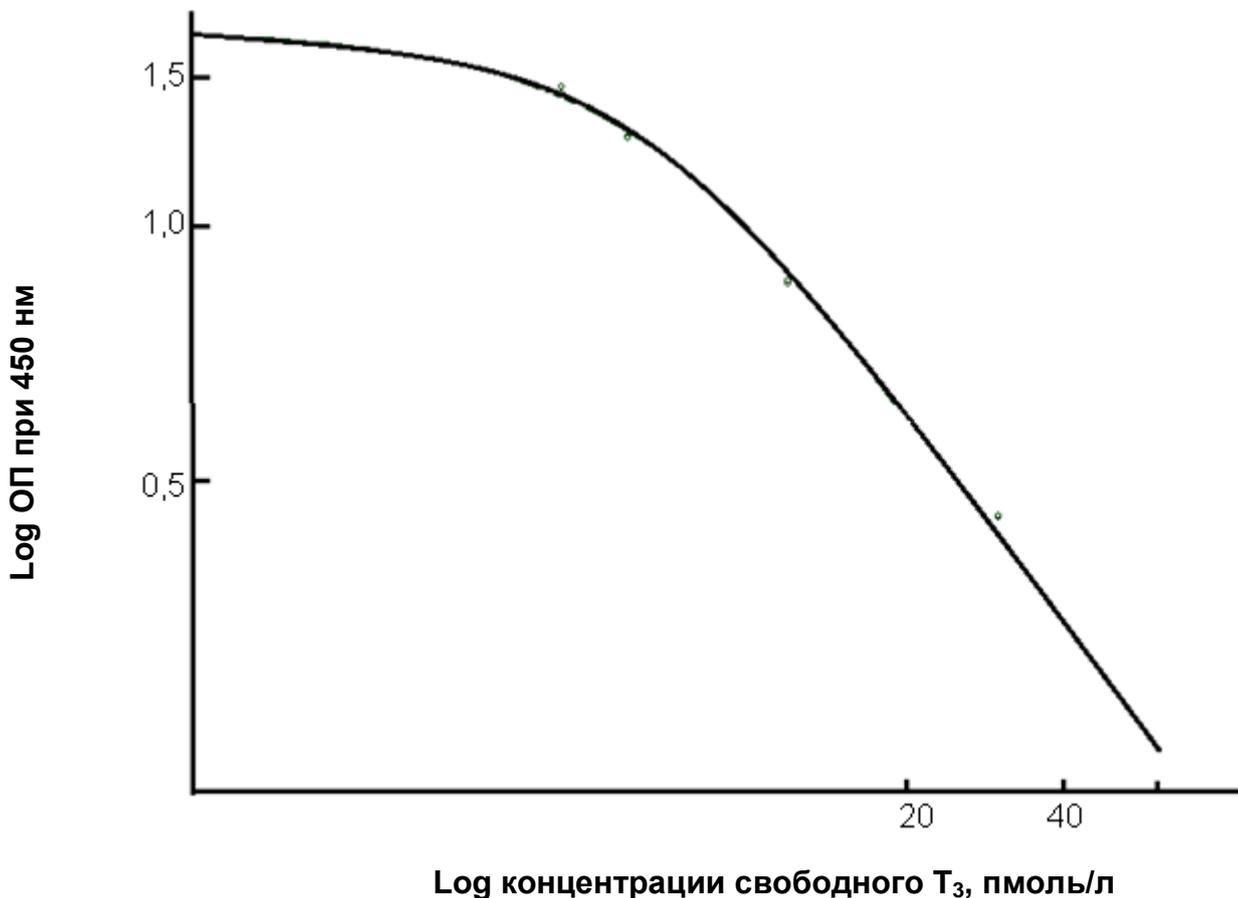


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ТироидИФА-свободный T₃» 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 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- буфер А, конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца;

- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток;

- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации свободного T_3 в контрольной сыворотке;

- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ, буфера А и стоп-реагента из ванночек во флаконы;

- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

10.8. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

А ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	80 мкл буфера А	КТ (+18 ... +25°C)	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		20 мкл КП и КС			
3		20 мкл исследуемых образцов			
4	Инкубация №1	—	+37°C	45'	Термостатируемый шейкер, 500 – 800 об/мин
5	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (4 раза)			1* промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл Н ₂ О
6	Внесение конъюгата	100 мкл конъюгата			Конъюгат не вносить в лунки для определения ОП ТМБ
7	Инкубация №2	—	+37°C	15'	Термостатируемый шейкер, 500-800 об/мин
8	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (4 раза)			1* промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл Н ₂ О
9	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
0	Инкубация с ТМБ	—	КТ	15 - 30'	В темноте
			+37°C	10'	Термостатируемый шейкер, 500-800 об/мин
11	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
12	Перемешивание		КТ	1 – 2'	Шейкер
13	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр , 450 нм, 405 нм (см.п. 8)
14	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/ соответствующее ПО

