

Код ОКП 939817

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 200 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические
системы»

И. Е. Колосов

г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-Тиронид-ТЗобщий»

Тест-система иммуноферментная для количественного определения
общего трийодтиронина

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-Тиронид-ТЗобщий» предназначен для количественного определения общего трийодтиронина (ТЗобщ) в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Трийодтиронин — тироидный гормон с молекулярным весом 650Да, является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. ТЗ циркулирует в крови в свободной и связанной (с тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), тироксинсвязывающим преальбумином и альбумином) формах. Количественное определение концентрации общего ТЗ в крови проводят для оценки функционального состояния щитовидной железы.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах в 48 пробах (41 неизвестная проба, пять калибровочных проб, одна проба контрольной сыворотки, одна проба для определения оптической плотности ТМБ - Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора: необходимо обязательное использование всех калибровочных проб при каждой постановке; набор может быть использован в течение месяца после вскрытия реагентов набора.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. При добавлении раствора 8-АНС-ТЗ-конъюгат ТЗ-пероксидаза и исследуемого образца, во время инкубации эндогенный ТЗ-общий сыворотки крови конкурирует с ТЗ, входящим в состав конъюгата, за связывание с моноклональными антителами к ТЗ, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами ТЗ и конъюгата ТЗ-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству ТЗ в образце сыворотки крови.

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

2.2. Состав набора:

- иммуносорбент – планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к трийодтиронину, маркирован «Иммуносорбент» — 1 шт;

- конъюгат - трийодтиронин (ТЗ), меченный пероксидазой хрена; прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость; маркирован «Конъюгат» — 1 фл. (12 мл);

- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества общего ТЗ; прозрачные или слегка

опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости; калибровочный материал может отличаться от заявленного по значениям концентрации общего ТЗ, значения концентраций трийодтиронина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества, маркированы:

«Калибратор 0» (0 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 1» (0,5 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 2» (2,5 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 3» (5,5 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 4» (8,3 нг/мл) - 1 фл. (0,5 мл).

- контрольная сыворотка с известным содержанием общего ТЗ; прозрачная или слегка опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость; значение концентрации трийодтиронина в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 фл. (0,5 мл);

- раствор 8-анилинонафтил-1-сульфо кислоты - блокатор связывания ТЗ с белками переносчиками; прозрачная зеленовато-коричневого цвета жидкость; маркирован «8-АНС» - 1 фл. (6,0 мл);

- промывочный раствор, концентрат; прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании; маркирован «ПР (концентрат х 25)» - 1 фл. (50,0 мл);

- ТМБ-Субстратный раствор; прозрачная бесцветная жидкость; маркирован «ТМБ-Субстратный раствор» - 1 фл. (12,0 мл);

- серная кислота в концентрации 0,2 моль/л; прозрачная бесцветная жидкость; маркирована «Стоп-реагент/0,2М» - 1 фл. (15,0 мл);

- бланк для построения калибровочной кривой – 1 шт;

- инструкция по применению – 1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

-крышка к полистироловым 96-луночным планшетами;

-одноразовые наконечники;

- пластиковая ванночка для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация общего ТЗ в сыворотке крови человека составляет 0,2 нг/мл.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения общего ТЗ в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации общего ТЗ имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1–№4. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» общего ТЗ – соответствие измеренной концентрации общего ТЗ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов калибровочной пробы №3 и контрольной сыворотки. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.5. Специфичность. Кросс-реактивность с близкородственными реагентами указана в таблице №1.

Таблица №1

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
Трийодтиронин	100
L-тироксин	0,0001
дийодтиронин	0,0001
тетрайодтироацетат	0,0001

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию общего ТЗ измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч у 250 здоровых людей в возрасте от 21 до

50 лет. Средняя концентрация ТЗобщего составила 1,22 нг/мл (от 0,56 до 1,88 нг/мл).

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций свободного ТЗ, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

4. Меры предосторожности

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. 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.).

4.4. Стоп-реагент представляет собой 0,2 М раствор серной 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.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. исследуемые образцы сывороток крови являются потенциально инфицированным материалом, в котором длительное время могут сохраняться возбудители ВИЧ, парентеральных вирусных гепатитов и других инфекционных заболеваний.

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, необходимые при работе с набором:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре от 18 до 24 °С или при температуре (37,0 ± 0,5) °С;
- устройство для промывания планшетов (вошер);
- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. Анализируемые образцы сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинаktivированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Недопустимо использование образцов с добавлением азидата натрия в качестве консерванта! Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным

ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

7. Подготовка реагентов для анализа

7.1. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре (от 18 до 24 °С).

7.2. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре (от 18 до 24 °С) в закрытом пакете не менее 30 минут!**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

7.3. ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды дистиллированной (см. табл. № 2). Полученный раствор тщательно перемешать.

7.4. Раствор 8-АНС – готов к применению.

7.5. Конъюгат – готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

7.6. Рабочий раствор конъюгата-8-АНС – готовить перед использованием, смешать объемы растворов конъюгата и 8-АНС в соотношении 2:1 (согласно таблице №2) в зависимости от используемого количества стрипов.

- 7.7. Калибровочные пробы - готовы к применению.
 7.8. Контрольная сыворотка, готова к применению.
 7.9. ТМБ-Субстратный раствор - готов к применению.
 7.10. Стоп-реагент – готов к применению.

Таблица № 2

**Расход реагентов набора в зависимости от количества
используемых стрипов**

	Рабочий промывочный раствор		Конъюгат (мл)	8-АНС (мл)	ТМБ- Субстратный раствор (мл)
	ПР (конц x25) (мл)	Вода дистиллированная (мл)			
2	10	240	2,0	1,0	2,0
3	15	360	3,0	1,5	3,0
4	20	480	4,0	2,0	4,0
5	20	480	5,0	2,5	5,0
6	20	480	6,0	3,0	6,0
7	20	480	7,0	3,5	7,0
8	20	480	8,0	4,0	8,0
9	20	480	9,0	4,5	9,0
10	20	480	10,0	5,0	10,0
11	20	480	11,0	5,5	11,0
12	20	480	12,0	6,0	12,0

8. Проведение анализа.

8.1. Калибровочные пробы и контрольную сыворотку рекомендуется вносить по следующей схеме:

в лунки иммуносорбента А-1, А-2 дозатором пипеточным внести по 25 мкл «Калибратора 0», в лунки В-1, В-2 - по 25 мкл «Калибратора 1», в лунки С-1, С-2 - по 25 мкл «Калибратора 2», в лунки D-1, D-2 – по 25 мкл «Калибратора 3», в лунки Е-1, Е-2 - по 25 мкл «Калибратора 4», в лунки F-1, F-2 - по 25 мкл контрольной сыворотки. Лунки G1, G2 оставить для измерения оптической плотности ТМБ – Субстратного раствора.

В остальные лунки внести дозатором по 25 мкл исследуемых сывороток в дублях. Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

8.2. Во все лунки, кроме G1 и G2, внести по 150 мкл смешанного реагента (конъюгат-8-АНС), стрипы планшета закрыть крышкой и инкубировать на шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин в течение 1 ч при комнатной температуре (от 18 до 24 °С) или в течение 45 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С.

8.3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

8.4. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратный раствора, планшет выдержать в течение от 20 до 30 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

8.5. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 30 секунд и провести учет результатов.

9. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны: 450 нм с настройкой прибора по «воздуху».

10. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках с ТМБ-Субстратным раствором не превышает 0,2.

Необходимо построить калибровочный график по средним величинам ОП «Калибратора 0»; «Калибратора 1»; «Калибратора 2»; «Калибратора 3»;

«Калибратора 4». На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации общего ТЗ, выраженной в нг/мл , по оси ординат Y откладывают средние значения ОП калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций общего ТЗ в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации общего ТЗ в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

11. Условия хранения и эксплуатации набора

11.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 13 месяцев.

11.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

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

- Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 месяца при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

- ПР (концентрат $\times 25$) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат $\times 25$) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить не более 3-х суток при температуре от 2 до 8 °С.

- Раствор 8-АНС – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным 8-АНС хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Конъюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Рабочий раствор конъюгата-8-АНС, подготовленный к использованию, хранению не подлежит.

- Калибровочные пробы - после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- ТМБ-Субстратный раствор - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении месяца при температуре от 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным Стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

11.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия,

г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

Директор ООО
«Научно-производственное объединение
«Диагностические системы»
по производству

Г. А. Полянская

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ
ДПО «РМАПО Росздрава»



Профессор Долгов В.В.

200 г.

Подпись В.В. Долгова
удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись: 25.09.08