

Код ОКП 939817

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 200 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»

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

И. Е. Колосов

«20.06.2008» г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
«ДС-ИФА-Тироксид-Т4общий»

Тест-система иммуноферментная для количественного определения
общего тироксина

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-Тироксид-Т4общий» предназначен для количественного определения общего тироксина (Т4общ) в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Тироксин – тиреоидный гормон с молекулярным весом 777 Да, является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. Т4 циркулирует в крови в свободной и связанной форме – с тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), тироксинсвязывающим преальбумином и альбумином. Количественное определение концентрации тироксина в крови имеет диагностическое значение при оценке функционального состояния щитовидной железы.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах в 48 пробах (40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора: необходимо обязательное использование всех стандартных 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-конъюгат Т4-пероксидаза и исследуемого образца, во время инкубации эндогенный Т4-общий сыворотки крови конкурирует с Т4, входящим в состав конъюгата, за связывание с моноклональными антителами к Т4, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами Т4 и конъюгата Т4-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству Т4 в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата Т4-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация общего Т4 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 тироксину, маркирован «Иммуносорбент» - 1 шт;

- конъюгат - тироксин (Т4), меченный пероксидазой хрена; прозрачная розового цвета жидкость; маркирован «Конъюгат» — 1 фл. (12,0 мл);

- стандартные калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества общего Т4; прозрачные или

слегка опалесцирующие бесцветные или светло-желтого цвета жидкости; значения концентраций тироксина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества, маркированы:

«Калибратор 0» - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 1» - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 2» - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 3» - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 4» - 1 фл. (0,5 мл);

«Калибратор 5» - 1 фл. (0,5 мл).

- контрольная сыворотка с известным содержанием общего Т4; прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость; значение концентрации тироксина в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 фл. (0,5 мл);

- раствор 8-анилинонафтил-1-сульфоуксусной кислоты - блокатор связывания Т4 с белками переносчиками; прозрачная зеленовато-коричневого цвета жидкость; маркирован «8-АНС» - 1 фл. (12,0 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 концентрация общего Т4 в сыворотке крови составляет 5 нмоль/л.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения общего Т4 в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8 %.

3.3. Зависимость концентрации общего Т4 имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2–№5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» общего Т4 – соответствие измеренной концентрации общего Т4 предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов калибровочной пробы №3 и контрольной сыворотки. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.5. Клиническая проверка. При измерении содержания тироксина у 305 взрослых здоровых людей средняя концентрация общего Т4 составила 106 нмоль/л (от 59 до 153 нмоль/л).

3.6. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций общего Т4, 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 $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$;
- 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 термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Недопустимо использование образцов с добавлением азида 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. Полученный раствор тщательно перемешать.

7.4. Раствор 8-АНС – готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

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

7.6. Рабочий раствор конъюгата-8-АНС – готовить перед использованием, смешать равные объемы растворов конъюгата и 8-АНС в зависимости от используемого количества стрипов.

7.7. Стандартные 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.

8. Проведение анализа.

8.1. Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку рекомендуется вносить по следующей схеме: в лунки иммуносорбента А-1, А-2 дозатором пипеточным внести по 25мкл «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 «Калибратора 5», в лунки G1 и G2 – по 25 мкл контрольной сыворотки. Лунки Н1 и Н2 оставить для измерения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки в двух повторах внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

8.2. Во все лунки планшета, кроме лунок Н1 и Н2, внести по 200 мкл смешанного реагента (конъюгат-АНС), стрипы планшета закрыть крышкой и инкубировать в термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин в течение 30 мин при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

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, закрыть крышкой и выдержать в течение от 15 до 20 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 10 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»; «Калибратора 5». На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации общего Т4, выраженной в нмоль/л, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций общего Т4 в образцах

считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации общего Т4 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 х 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 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.

- 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.

