



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп.3
Факс (017) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-Т₄-свободный

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1. Набор ИФА-Т₄-свободный предназначен для определения концентрации свободного тироксина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием моноклональных антител "in vitro".

2. ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1. Состав набора:

№	Название компонента	Количество
1	Иммуносорбент (96-луночный стриповый планшет с иммобилизованными моноклональными антителами к тироксину)	1 шт.
2	КРП (Концентрат раствора для промывания планшета)	1 фл., 20 мл
3	РРК (раствор для разведения конъюгата)	1 фл., 13 мл
4	Конъюгат	1 мкпр., 0,7 мл
5	Калибровочные пробы (C ₀ -C ₅), в диапазоне концентраций Т ₄ -св. (0-100) пмоль/л (точные значения концентраций Т ₄ -св. указываются на этикетках флаконов)	6 фл. по 0,5 мл
6	КС (контрольная сыворотка)	1 фл., 0,5 мл
7	СБР (субстратный буферный раствор)	1 фл., 13 мл
8	Раствор ТМБ (хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин)	1 фл., 1,0 мл
9	Стоп-реагент	1 фл., 13 мл

Примечания:

- СБР и раствор ТМБ могут поставляться в одном флаконе;
- Конъюгат может поставляться в готовом для использования виде без включения РРК в состав набора.
- Тироксин – гормон, вырабатываемый щитовидной железой. Концентрация Т₄-св. в сыворотке крови является важным показателем функции щитовидной железы. Уровень Т₄-св. снижается при гипотиреозе, тогда как гипертиреоз сопровождается повышением его концентрации.

Принцип работы набора состоит в следующем. В лунке планшета, содержащей компоненты набора и образец сыворотки крови, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом (Т₄, меченный пероксидазой хрена) и эндогенным Т₄ анализируемого образца сыворотки крови с моноклональными антителами, иммобилизованными на стенках лунки. После отмывания не связавшихся компонентов в лунку планшета вносят раствор субстрата пероксидазы (перекись водорода) и раствора ТМБ. Пероксидазную реакцию останавливают путем добавления стоп-реагента (0,5М раствора серной кислоты). Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Величина ОП обратно пропорциональна концентрации свободного Т₄ в крови. Чем ниже содержание Т₄-св. в образце сыворотки крови, тем выше интенсивность окрашивания раствора в лунке.

2.3 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 41 неизвестной пробы, 6 калибровочных проб и 1 пробы КС, всего 96 определений.

Набор рассчитан на 3 постановки иммуноферментного анализа: 1 постановка – 4 стрипа (32 лунки).

2.4 Набор позволяет определять концентрацию Т₄-св. в сыворотке крови человека в интервале от 5 до 100 пмоль/л.

2.5 Продолжительность анализа составляет 2 ч.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.2 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.3 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания не пригодны для анализа.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо использовать пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

5.1 Фотометр типа "Multiskan EX" или Ф300 для измерения оптической плотности;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,01 до 5,000 мл (от 10 до 5000 мкл);
- пипетки 8-ми канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл (от 50 до 300 мкл);
- суховоздушный термостат на температуру 37 °С;
- цилиндры мерные вместимостью 25 и 500 мл;
- стакан мерный вместимостью 500 мл;
- ванночки для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Пегри;
- флаконы стеклянные вместимостью 10 мл;
- клейкая пленка или крышка;
- бумага фильтровальная;
- перчатки хирургические резиновые;
- вода дистиллированная.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

6.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-22) °С в течение 30 мин.

6.2 Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца; при температуре минус 20 °С - в течение всего срока годности набора.

6.3 Подготовка стрипов

Перед началом работы извлечь необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Стрипы, которые не используются в данной постановке, можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8) °С в течение трех месяцев.

6.4 Приготовление раствора для промывания планшета

Если КРП содержит кристаллы, его необходимо перед использованием прогреть при температуре (35-37) °С до полного растворения кристаллов.

Содержимое флакона с КРП интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. В мерный стакан отобрать необходимый объем КРП, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), довести дистиллированной водой до нужного объема и перемешать полученный раствор.

Таблица 1

Количество используемых стрипов	Раствор для промывания планшета		Раствор конъюгата		Проявитель	
	КРП,	Дистиллированная вода, до	Конъюгат,	РРК,	Раствор ТМБ,	СБР,
	мл	мл	мл	мл	мл	мл
4	4	180	0,2	4	0,2	4
8	8	360	0,4	8	0,4	8
12	12	540	0,6	12	0,6	12

Раствор для промывания планшета можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 сут.

6.5 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

В чистый флакон с пробкой отобрать заданный количеством используемых стрипов объем РРК, внести необходимое количество конъюгата (таблица 1). Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

6.6 Приготовление хромоген-субстратного раствора

ВНИМАНИЕ! Хромоген-субстратный раствора готовят непосредственно перед использованием в защищенном от света месте. Раствор хранению не подлежит!

В чистый флакон внести объем СБР, заданный числом, используемых стрипов, и необходимый объем раствора ТМБ (таблица 1). Смесь интенсивно перемешать в течение (30-40) с.

Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с раствором проявителя, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

6.7 Стоп-реагент готов к использованию.

6.8 После вскрытия флаконов с КРП, РРК, конъюгатом, СБР, раствором ТМБ и стоп-реагентом растворы можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

7 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОМЫВАНИЮ ПЛАНШЕТА

7.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них; лунки должны заполняться до краев (0,2-0,3 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок;

- необходимо выдерживать лунки заполненными раствором для отмывания планшетов не менее 30 с;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Составить протокол маркировки лунок в соответствии со схемой 1. Лунки маркировать следующим образом:

A1, B1 – для C ₀ ;	A2 - B2 – для C ₄ ;
C1 - D1 – для C ₁ ;	C2 - D2 – для C ₅ ;
E1 - F1 – для C ₂ ;	E2 - F2 – для КС;
G1 - H1 – для C ₃ ;	G2 - ... – для X _i (образцов исследуемых сывороток крови человека).

Схема 1

	1	2	3	4
A	C ₀	C ₄	X ₂	X ₆
B	C ₀	C ₄	X ₂	X ₆
C	C ₁	C ₅	X ₃	X ₇
D	C ₁	C ₅	X ₃	X ₇
E	C ₂	КС	X ₄	X ₈
F	C ₂	КС	X ₄	X ₈
G	C ₃	X ₁	X ₅	X ₉
H	C ₃	X ₁	X ₅	X ₉

8.2 Отобрать из каждого флакона с калибровочными пробами и контрольной сывороткой и из пробирок с исследуемыми образцами по 0,025 мл (25 мкл) раствора и внести в соответствующие лунки по схеме 1.

8.3 Во все лунки внести по 0,1 мл (100 мкл) раствора конъюгата в рабочем разведении (п.6.5).

Перемешать содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности стола.

8.4 Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч.

8.5 Удалить содержимое из всех лунок с помощью промывателя или 8-ми канальной пипетки, затем все лунки планшета промыть 4 раза раствором для промывания планшета (п.6.4) и удалить остатки влаги, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге (п.7.1).

8.6 В каждую лунку планшета внести по 0,1 мл хромоген-субстратного раствора (п.6.6).

Планшет заклеить пленкой или закрыть крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 20 мин.

8.7 Остановить реакцию путем внесения во все лунки планшета по 0,1 мл стоп-реагента.

8.8 Встряхнуть планшет и, не позже чем через 10 мин после остановки реакции, определить ОП раствора в лунках при длине волны 450 нм.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

9.1 Рассчитать средние арифметические значения ОП (В_i), в ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы – C₀ – C₅, контрольную сыворотку – КС, исследуемые образцы сыворотки крови – X_i.

На основании полученных данных определить соответствие в ряду неравенств В₀>В₁>В₂>В₃>В₄>В₅, в ОЕ.

9.2 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах откладывая по оси ординат значения ОП (в ОЕ), а по оси абсцисс - значения концентраций Т₄-св. (пмоль/л) в соответствующих калибровочных пробах.

9.3 Определить по калибровочному графику содержание Т₄-св. в КС. Содержание Т₄-св. в КС должно соответствовать указанному на этикетке значению.

9.4 По калибровочному графику определить содержание Т₄-св. в исследуемых образцах сыворотки крови человека.

10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

10.1 Специфичность

В наборе ИФА-Т₄-свободный при изготовлении иммуносорбента используют высокоспецифичные моноклональные антитела к Т₄, что исключает возможность перекрестной реакции со структурными аналогами Т₄.

10.2 Чувствительность

Минимальная концентрация Т₄-св., достоверно определяемая с помощью набора, составляет не более 2,0 пмоль/л.

10.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=14) концентрации Т₄-св. в образцах сыворотки крови с использованием набора не превышает 10%.

10.4 Клиническая проверка набора

Концентрация свободного Т₄ в сыворотке крови здоровых лиц в возрасте от 20 до 45 лет, определенная с помощью набора ИФА-Т₄-свободный, составила (10-23) пмоль/л.

10.5 Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентрации Т₄-св., соответствующие нормальным, т.к. указанная выше норма меняется в зависимости от региона проживания обследуемых лиц.

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

Замораживать набор запрещается.

11.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

11.3 Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления набора.

Библиография

- [1] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения.
Методы, средства и режимы