



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической 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 РЕАКТИВОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-ТТГ

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИФА-ТТГ предназначен для количественного определения тиреотропного гормона в сыворотке крови и человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 Количественное определение уровня тиреотропного гормона в крови необходимо для диагностики нарушений в системе гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1. Состав набора:

Таблица 1 – Состав набора

№	Название компонента	Количество
1	Иммуносорбент (96-луночный стриповый планшет с иммобилизованными моноклональными антителами к ТТГ)	1 шт.
2	Концентрат раствора для промывания планшета (КРП)	1 фл. 20 мл
3	Раствор для разведения сывороток и конъюгата (РРСК)	1 фл. 40 мл
4	Субстратный буферный раствор (СБР)	1 фл., 25 мл
5	Конъюгат	1 мкпр. 1,0 мл
6	Раствор ТМБ	1 фл., 1,3 мл
7	Калибровочные пробы (0-20 мМЕ/л) (КП)	6 мкпр. по 0,7 мл
8	Контрольная сыворотка (КС)	1 мкпр., 0,7 мл
9	Стоп-реагент	1 фл., 13 мл

2.2 Набор ИФА-ТТГ рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестных, одной контрольной и 6 калибровочных проб – всего 96 определений. Количество реагентов рассчитано на 3 постановки по 4 стрипа.

Принцип работы набора состоит в следующем.

На первой стадии анализа в лунки иммуносорбента вносят калибровочные, контрольную и анализируемые пробы. В ходе последующей инкубации происходит образование иммунного комплекса между иммобилизованными на иммуносорбенте моноклональными антителами к тиреотропному гормону (ТТГ) и находящимся в растворе ТТГ. Количество ТТГ на твердой фазе прямо пропорционально его содержанию в составе калибровочных проб и анализируемых образцов сыворотки крови. ТТГ, не связанный иммобилизованными моноклональными антителами удаляется при промывке иммуносорбента.

На второй стадии происходит образование комплекса между ТТГ, находящимся на твердой фазе в составе иммунного комплекса и конъюгатом. Не вступивший в реакцию конъюгат удаляется при промывке. Во время инкубации с хромоген-субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Пероксидазную реакцию останавливают путем добавления стоп-реагента, содержащего 0,5 М серную кислоту. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Величина ОП обратно пропорциональна количеству ТТГ в образце сыворотки крови. На основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация ТТГ в определяемых образцах.

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 вирусных инфекций.

3.2 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1] и [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. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- 4.1. Набор реактивов ИФА-ТТГ;
 - спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при 450 нм;
 - полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
 - встряхиватель для планшета;
 - пипетки 8-канальные полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 мл до 0,3 мл,
 - пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 мл до 5,0 мл;
 - стаканы лабораторные стеклянные вместимостью 20-1000 мл;
 - флаконы вместимостью 30 мл;
 - ванночки для реагентов вместимостью 60 мл;
 - клеякая лента или крышка;
 - вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

5.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Подготовка стрипов

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

5.3 Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

5.4 Приготовление раствора для промывания

Содержимое флакона концентрата раствора для промывания планшета интенсивно встряхнуть, отобрать в мерный стакан необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), добавить дистиллированной воды до нужного объема и перемешать раствор.

Раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток.

5.5 Приготовление раствора конъюгата

В чистый флакон отобрать определенный объем конъюгата, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), и необходимый объем РРСК, тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием

5.6 Приготовление хромоген-субстратного раствора.

В чистый флакон отобрать определенный объем СБР, заданный количеством используемых стрипов (таблица 2), и необходимый объем ТМБ, тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! Хромоген-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием! Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным.

Таблица 2

Количество используемых стрипов	Раствор для промывания планшета		Хромоген-субстратный раствор		Раствор конъюгат	
	КРП, мл	Дистиллир. вода, мл	ТМБ, мл	СБР, мл	Конъюгат, мкл	РРСК, мл
4	5	225	0,4	8	320	8
8	10	450	0,8	16	640	16
12	20	900	1,2	24	960	24

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Составить протокол маркировки лунок. Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом: N1 - B₀, N2 - B₁, N3 - B₂, N4 - B₃, N5 - B₄, N6 - B₅, №7 – Вкс, N7 – N_x - неизвестные образцы.

6.2 Во все промаркированные лунки, внести по 0,1 мл раствора для разведения сывороток и конъюгата.

6.3 Отобрать из каждой микропробирки с калибровочными пробами, контрольной сывороткой и неизвестными образцами по 0,1 мл раствора и внести в соответствующие лунки.

6.4 Планшет закрыть крышкой или заклеить пленкой и инкубировать при постоянном встряхивании в течение 1 ч. и температуре (18-25) °С

6.5 Удалить содержимое лунок. Все лунки промыть 3 раза проточной водой (по 0,3 мл в лунку). Удалить остатки жидкости.

6.6 Во все лунки, внести по 0,2 мл раствора конъюгата, приготовленного по п. 5.5

6.7. Планшет закрыть крышкой или заклеить пленкой и инкубировать при постоянном встряхивании в течение 1 ч. и температуре (18-25) °С

6.8 Удалить содержимое лунок. Все лунки промыть 3 раза проточной водой (по 0,3 мл в лунку). Удалить остатки жидкости.

6.9 Во все лунки внести по 0,2 мл хромоген-субстратного раствора, приготовленного по п. 5.6 Инкубировать планшет при комнатной температуре в темноте, в течение 15-25 мин., в зависимости от степени развития окраски.

6.10 Остановить реакцию добавлением во все лунки по 0,1 мл стоп-реактанта. Перемешать содержимое лунок 5-6 круговыми движениями по поверхности стола. Измерить на спектрофотометре оптическую плотность раствора во всех лунках при 450 нм не позже чем через 15 мин после остановки реакции.

7. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

7.1. Рассчитать средние арифметические значения ОП (Vi), в ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыворотку – КС, исследуемые образцы сыворотки крови – Xi.

7.2. Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая по оси ординат значения ОП (в ОЕ), а по оси абсцисс – значения концентраций тиреотропного гормона (мМЕ/л) в соответствующих калибровочных пробах.

7.3. Определить по калибровочному графику содержание тиреотропного гормона в КС. Содержание тиреотропного гормона в КС должно соответствовать значению, указанному на этикетке.

7.4. По калибровочному графику определить содержание тиреотропного гормона в исследуемых образцах сыворотки крови человека.

8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1. Специфичность.

Перекрестная реакция антител к ТТГ с соматотропным гормоном, хорионическим гонадотропином, лютеинизирующим гормоном и фолликулостимулирующим гормоном не превышает 0,01%.

8.2. Воспроизводимость результатов.

Коэффициент вариации результатов 10 определений концентрации тиреотропного гормона в образцах сыворотки крови с использованием набора ИФА-ТТГ не превышает 10%.

8.3 Тест на «открытие».

Процент «открытия» тиреотропного гормона, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией тиреотропного гормона, составляет (80-120)%.

8.4. Клиническая проверка набора. Содержание тиреотропного гормона в сыворотке крови у здоровых доноров составляет: 0,4-5,0 мМЕ/л, при гипертиреозе – менее 0,4 мМЕ/л, гипотиреозе – более 5,0 мМЕ/л в соответствии с данными литературы.

8.5 Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора ИФА-ТТГ уточнить значения концентраций тиреотропного гормона, соответствующие нормальным.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Набор реагентов ИФА-ТТГ должен храниться в сухом помещении при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности. После вскрытия флаконов с КРП, СБР, хромогеном ТМБ, аналитическим буферным раствором и стоп-реактантами растворы можно хранить при температуре (2-8)° С в течение всего срока годности. После вскрытия микропробирок растворы КРП и КС можно хранить при температуре (2-8)°С не более 1 месяца, при температуре не менее минус 20 °С - в течение всего срока годности набора. Допускается однократное замораживание и размораживание калибровочных проб и контрольной сыворотки.

9.2. Не допускается смешивание компонентов наборов разных серий. Во время проведения анализа следует избегать подсыхания лунок на всех этапах постановки анализа и попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

9.3. 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 не более 72 ч после взятия пробы. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20 °С) не более одного раза. 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 и содержащие азид натрия не пригодны для анализа.

9.4 Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдать инструкцию по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

9.5. Срок годности набора 6 месяцев с даты изготовления набора.