



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
ОБЩЕГО ТИРОКСИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

ИФА-Т₄ общий

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
2005 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

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

1.2. Тироксин – гормон, вырабатываемый щитовидной железой. Концентрация общего тироксина в сыворотке крови является важным показателем функции щитовидной железы. Уровень общего тироксина снижается при гипотиреозе, тогда как гипертиреоз сопровождается повышением его концентрации.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1. Состав набора:

1	Иммуносорбент	1 планшет
2	Конъюгат	1 мкпр., 0,7 мл
3	Калибровочные пробы (C ₀ -C ₅), в диапазоне концентраций Т ₄ (0; 25-400) нмоль/л (точные значения указываются на этикетках микропробирок	6 мкпр. по 0,1 мл
4	Контрольная сыворотка	1 мкпр., 0,1 мл
5	Раствор для разведения конъюгата (РРК)	1 фл., 13 мл
6	Концентрат раствора для промывания планшета (КРП)	1 фл., 13 мл
7	Субстратный буферный раствор (СБР)	1 фл., 13 мл
8	Раствор ТМБ	1 фл., 1,0 мл
9	Стоп-реагент	1 фл., 13 мл
	Примечание: * мкпр. – микропробирка.	

2.2 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 хромогена ТМБ. Пероксидазную реакцию останавливают путем добавления стоп-реагента (0,5 М 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 общего Т₄ в крови. Чем ниже содержание Т₄ 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 Диапазон определяемых концентраций Т₄ – (15-400) нмоль/л.

2.5 Продолжительность анализа составляет 3 ч.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1. Присутствие в наборе ИФА-Т₄ общий некоторых биологических компонентов, источником которых является человек (калибровочные пробы и контрольная сыворотка), химикатов, а также работа со всеми исследуемыми образцами сывороток, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты (согласно Приказов МЗРБ № 66 и № 351);

- использовать полуавтоматические пипетки;
- все жидкие отходы необходимо обрабатывать раствором с массовой долей перекиси водорода 6% при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы необходимо собирать в специальный контейнер и затем автоклавировать в течение 1 ч при температуре 120 °С;
- инструменты и оборудование, а также рабочие поверхности, на которых проводился анализ, необходимо до и после работы протирать в течение нескольких секунд раствором с объемной долей этилового спирта 70° либо другими синтетическими средствами вируцидного действия.

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 агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов 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 добавленным азидом натрия, гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина или 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;
- 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" для измерения оптической плотности или аналогичный;

- 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 37°С;
- цилиндры мерные вместимостью 25 и 500 мл;
- стакан мерный вместимостью 500 мл;
- ванночки для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- флаконы стеклянные вместимостью 10 мл;
- клейкая пленка или крышка;
- бумага фильтровальная;
- перчатки хирургические резиновые;
- вода дистиллированная;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

(из расчета на 4 стрипа, 32 лунки)

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

6.2. Приготовление раствора для промывания планшета.

Содержимое флакона с концентратом раствора для промывания планшета интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с. Отобрать 4 мл концентрата в мерный цилиндр, довести объем дистиллированной водой до 180 мл и перемешать полученный раствор.

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

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

6.3 Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении.

В чистый флакон с пробкой отобрать 4мл РРК и внести 0,2мл конъюгата. Содержимое флакона тщательно перемешать, не допуская образования пены.

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

6.4. Приготовление хромоген-субстратного раствора.

В чистый флакон с пробкой внести 4 мл СБР, добавить 0,2 мл раствора ТМБ и тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! Раствор проявителя готовят непосредственно перед использованием и, до внесения в лунки, ставят в защищенное от света место. Раствор хранению не подлежит.

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 ТМБ, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

6.5. При использовании в работе 8 или 12 стрипов подготовку реагентов к проведению анализа необходимо проводить в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

	КРП, мл	Вода дистил., мл	Конъюгат, мл	РРК, мл	Раствор ТМБ, мл	СБР, мл
4 стрипа	4	до 180	0,2	4	0,2	4
8 стрипов	8	до 360	0,4	8	0,4	8
12 стрипов	12	до 540	0,6	12	0,6	12

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 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 при температуре (2-8) °С в течение трех месяцев.

7.2 Составить протокол маркировки лунок в соответствии со схемой 1.

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

где C₀- C₅ – калибровочные пробы, КС – контрольная сыворотка, X₁- X₉- исследуемые образцы сыворотки крови.

Внимание! Схема приведена для варианта в котором используются 4 стрипа.

7.3 Во все лунки внести по 0,1мл (100 мкл) раствора конъюгата (п.6.3.).

7.4 Отобрать из каждой микропробки с калибровочными пробами, контрольной сывороткой и исследуемыми образцами по 0,01мл (10мкл) раствора и внести их в соответствующие лунки (на каждую лунку необходимо использовать отдельный наконечник, при внесении необходимо аккуратно пипетировать растворы в лунках 2-3 раза) в соответствии со схемой 1.

7.5 Перемешать содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности стола, закрыть планшет крышкой и инкубировать в термостате при температуре 37° в течение 2-х часов.

7.6 Удалить содержимое лунок с помощью вошера или 8-канальной пипетки. Все лунки промыть 4 раза раствором для промывания планшета (п.6.2.) – по 0,3 мл в лунку. Необходимо выдерживать лунки заполненными раствором для отмывания планшетов не менее 30 с. Удалить остатки жидкости, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге.

7.7 Внести во все лунки по 0,1мл (100 мкл) хромоген-субстратного раствора (п.6.4.). Накрыть планшет крышкой и инкубировать в темном месте при температуре (18-25) °С в течение 15 – 20 мин по мере развития окраски.

7.8 Остановить реакцию внесением во все лунки по 0,1мл (100 мкл) раствора стоп-реагента и, не позже чем через 5 мин. определить оптическую плотность (ОП) раствора в лунках при длине волны 450 нм.

8 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.

8.1 Рассчитать средние арифметические значения ОП, в ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы – В₀ – В₅, контрольную сыворотку – В_{КС}, исследуемые образцы сыворотки крови – В_х. Определить, соблюдается ли соотношение В₀ > В₁ > В₂ > В₃ > В₄ > В₅.

8.2 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат значения ОП, в ОЕ, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентрации Т₄ в калибровочных пробах (нмоль/л).

8.3 Определить по калибровочному графику содержание Т₄ в КС. Содержание Т₄ в КС должно соответствовать диапазону значений, указанному на этикетке.

8.4 Определить по калибровочному графику содержание тироксина в исследуемых образцах.

9 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

9.1 Специфичность.

В наборе, при изготовлении иммуносорбента, используются высокоспецифичные моноклональные антитела к Т₄, что исключает возможность перекрестной реакции со структурными аналогами тироксина.

9.2 Чувствительность.

Минимальная, достоверно определяемая с помощью набора концентрация тироксина, составляет 15 нмоль/л.

9.3 Воспроизводимость результатов.

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

9.4 Тест на «открытие».

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

9.5 Клиническая проверка набора.

Содержание тироксина в сыворотке крови пациентов в возрасте от 20 до 45 лет составляет 60-160 нмоль/л. Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентрации тироксина соответствующие нормальным, т.к. указанная выше норма меняется в зависимости от региона проживания обследуемых лиц.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1 Хранение набора должно производиться в чистом, сухом помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности. Допускается однократное замораживание и размораживание КИ и КС.

10.2 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

10.3 Некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

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

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