

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТРИЙОДТИРОНІНУ В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «Т3-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «Т3-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації трийодтироніну в сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Трийодтиронін (Т3) - гормон з молекулярною масою 651 дальтон, 58% якого складає йод. Тироксин (Т4) і 3,5,3'-трийодтиронін (Т3) - гормони, що виробляються щитоподібною залозою і які циркулюють в крові як у вільній, так і в зв'язаній формі - в основному, з тироксинзв'язуючим глобуліном (ТСГ). Гормональною активністю володіють тільки вільні Т3 і Т4, проте їх частка дуже мала: 0.03% від загального змісту для Т4 і 0.3% - для Т3. Концентрація Т3 нижче, ніж Т4, проте його метаболічна активність приблизно в 3 рази вище. Близько 80% Т3, що знаходиться в сироватці, утворюється за рахунок дейодування Т4 в периферичних тканинах, і тільки невелика його кількість утворюється прямим синтезом в щитоподібній залозі. Тому при гіпотиреозі рівень Т3 може тривалий час перебувати на нижній межі норми, так як його втрата може компенсуватися підвищенням перетворенням Т4 в Т3. Показаннями до визначення загального Т3 служить початкова стадія гіперфункції щитоподібною залозі; диференціальна діагностика гіпертиреозу; рецидив гіпертиреозу; гострий гіпертиреоз після лікування L-тироксином. Кількісне визначення загального Т3 особливо інформативне при Т3-тиреотоксикозі, тому що у 5-10% хворих рівень Т4 істотно не змінюється, а концентрація Т3 різко збільшується. При гіпотиреозі діагностична цінність визначення Т3 невелика, тому що часто при клінічних ознаках гіпотиреозу показники Т3 залишаються в нормі. Підвищення рівня Т3 спостерігається при ранній недостатності функції щитоподібною залозі, прийомі естрогенів, пероральних контрацептивів, героїну, метадону, ендемічного зобу. Під час вагітності рівень Т3 зростає в кілька разів, а потім нормалізується після пологів протягом декількох днів. Зниження рівня Т3 відзначається при гіпофункції щитоподібною залозі, гострому і підгострому тиреоїдиті, після прийому андрогенів, дексаметазону, саліцилатів, похідних кумарину.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення трийодтироніну ґрунтується на використанні конкурентного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані кролячі поліклональні антитіла проти Т3. Трийодтиронін зі зразка конкурує з кон'югованим Т3 за зв'язування з антитілами на поверхні лунки. В результаті утворюється зв'язаний з твердою фазою комплекс, що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина в лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації трийодтироніну в досліджуваному зразку. Концентрацію трийодтироніну в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту трийодтироніну в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність. Перехресна реакція кролячих поліклональних антитіл проти Т3 з іншими аналітами наведена в таблиці:

Аналіт	Перехресна реакція, %
L-Т3	100
D-Т3	100
L-тироксин	0.01
D-тироксин	0.04

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту Т3 у тому самому зразку сироватки (плазми) крові з використанням Набору «Т3-ІФА» не перевищує 8.0%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації Т3 в зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, яка не містить Т3, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 0.75-15 нмоль/л і становить $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» - відповідність вимірної концентрації Т3 підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки і калібрувальної проби 1.5 нмоль/л. Відсоток «відкриття» становить 90-110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «Т3-ІФА» концентрація Т3 в сироватці (плазмі) крові не перевищує 0.2 нмоль/л.

4. СКЛАД НАБОРУ

	Код компонента	Символ	Найменування	К-ть	Од.	Опис
1	P211Z	SORB MTP	Планшет 96-лунковий, полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт	-
2	C211Z	CAL 1 - 5	Калібрувальні проби на основі трис-буфера (pH 7.2-7.4), що містять відомі кількості трийодтироніну - 0; 0.75; 1.5; 7.5; 15 нмоль/л, готові до використання (по 0.8 мл кожна)	5	шт	прозорі рідини синього кольору (калібрувальна проба С1- прозора безбарвна рідина)
3	Q211Z	CONTROL	Контрольна сироватка на основі сироватки крові людини з відомим вмістом трийодтироніну, готова до використання (0.8 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
4	T211XZ	CONJ 2X	Концентрат кон'югату (7 мл)	1	шт	прозора рідина синього кольору
5	ST211Z	DIL CONJ	Буфер для розведення концентрату кон'югату, готовий до використання (7 мл)	1	шт	прозора рідина синього кольору
6	R055Z	SUBS TMB	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ), готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
7	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат розчину для відмивання, 26х-кратний (22 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
8	R050Z	STOP	Стоп-реагент, готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
9	N003	-	Плівка для заклеювання планшета	2	шт	-
10	K211I	-	Інструкція з використання Набору реагентів «ТЗ-ІФА»	1	шт	-
11	K211Q	-	Паспорт контролю якості Набору реагентів «ТЗ-ІФА»	1	шт	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5.0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях що використовується, є нетоксичним.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При попаданні на шкіру та слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.2. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

5.3. При роботі з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавичками, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати ВІЛ, вірус гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.4. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

5.5. Усі використані одноразові матеріали необхідно обробити дезінфікуючими засобами з подальшою утилізацією (див. ДСанПіН «Державні санітарно-протиепідемічні правила і норми щодо поводження з медичними відходами»).

5.5. Медичні відходи класу Б. Утилізацію або знищення, дезінфекцію Наборів реагентів слід проводити у відповідності з ДСанПіН «Державні санітарно-протиепідемічні правила і норми щодо поводження з медичними відходами» та ДСанПіН «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я».

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, які дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 25–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору і досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18\text{...}+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити на рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишились невикористаними, ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2\text{...}+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом всього терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води і ретельно перемішати. У разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

7.4. Приготування кон'югату.

Приготуйте кон'югат: для цього розведіть концентрат кон'югату в 2 рази буфером для розведення концентрату кон'югату. **УВАГА!** Розведений розчин кон'югату не зберігається! Розводьте тільки ту частину концентрату кон'югату, яка є необхідною для даного аналізу.

Приклад: на 1 стрип (8 лунок) необхідно 900 мкл кон'югату: 450 мкл концентрату кон'югату + 450 мкл буфера для розведення концентрату кон'югату.

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «ТЗ-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі $+2\text{...}+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом усього терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ не довше 15 діб.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторах 42 досліджуваних зразків, 5 калібрувальних проб та 1 контрольної сироватки (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишились невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі $+2\text{...}+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом всього терміну придатності Набору;

- калібрувальні проби, контрольну сироватку, буфер для розведення концентрату кон'югату, концентрат кон'югату, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі $+2\text{...}+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом всього терміну придатності Набору.

- концентрат розчину для відмивання необхідно зберігати при температурі $+2\text{...}+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом всього терміну придатності Набору;

- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі ($+18\text{...}+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не довше 15 діб або при температурі $+2\text{...}+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ не довше 45 діб.

Важливе зауваження: Після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. При використанні Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного визначення необхідна побудова нового калібрувального графіка та використання контрольної сироватки.

8.5. Не використовуйте компоненти з інших наборів або з аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків у повторах і 12 лунок калібрувальних проб і контрольної сироватки.
2	Приготуйте кон'югат: для цього розведіть концентрат кон'югату в 2 рази буфером для розведення концентрату кон'югату. УВАГА! Розбавлений розчин кон'югату не зберігається. Розводьте тільки ту частину концентрату кон'югату, яка необхідна для даного аналізу. Приклад: на 1 стрип (8 лунок) знадобиться 900 мкл кон'югату: 450 мкл концентрату кон'югату + 450 мкл буферу для розведення концентрату кон'югату.

3	Внесіть у відповідні лунки в двох повторах по 25 мкл калібрувальної проби і контрольної сироватки. В лунки, що залишилися, внесіть у двох повторах по 25 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків необхідно провести протягом 15 хвилин.
4	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
5	Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 60 хвилин при температурі +37°С.
6	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів. При кожному відмиванні додавайте у всі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п.7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаляйте рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видалити залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
7	Внесіть у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2-3 хв. Інкубуйте планшет в темряві при кімнатній температурі (+ 18 ... + 25°С) протягом 10-20 хвилин в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
8	Внесіть у всі лунки з тією ж швидкістю і в тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
9	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за повітрям.
10	Побудуйте в напівлогарифмічних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) - десятиковий логарифм концентрації ТЗ в калібрувальних пробах (нмоль/л), вісь ординат (y) - оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіка використовуйте інтервальний (відрізково-лінійний, «від точки до точки») метод. Прирівняйте концентрацію калібрувальної проби С1 до нескінченно малої величини, наприклад, 0.001 нмоль/л.
11	Визначте за калібрувальним графіком вміст ТЗ в досліджуваних зразках.

10.ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ І НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, проведених ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо користуватися нормами, наведеними нижче. Разом з тим, відповідно до правил GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна сама визначити параметри норми, характерні для обстежуваної популяції.

Примітка: значення концентрацій ТЗ в досліджуваних зразках, що знаходяться нижче межі чутливості Набору (0.2 нмоль/л), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (15 нмоль/л) належить приводити в такій формі: «в досліджуваному зразку X концентрація ТЗ нижча за 0.2 нмоль/л» або «вища за 15 нмоль/л».

У Наборі «ТЗ-ІФА» значення концентрацій калібрувальних проб виражені в нмоль/л. Для перерахунку концентрації в нг/мл, отримане значення концентрації в нмоль/л необхідно домножити на 0.65.

1 нмоль/л = 0.65 нг/мл.

Досліджувана група	Одиниці нмоль/л		Одиниці дод. нг/мл	
	Нижня межа	Верхня межа	Нижня межа	Верхня межа
Здорові донори	1.2	3.2	0.8	2.1

1. Physiology of thyroid hormones. IN: Division of Drugs and Toxicology, American Medical Association: Drug Evaluations Annual 1995. Amer Med Assn, Chicago, 1995, ch 47, pp 1039-1040.

2. Robins J & Rall JE. The Iodine -Containing Hormones. IN Hormones in Blood (2nd ed) 1: 383-490, Gray CH & Bacharach AL (eds) London Academic Press, 1987

З питань якості Набору «ТЗ -ІФА» звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:
м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23
тел./факс: + 38 (044) 422-62-16
email: info@xema.com.ua
www.xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ «ХЕМА»
Коваленко Єліна Володимирівна