

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	2
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СКЛАД НАБОРУ	4
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	5
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	8
11. ЛІТЕРАТУРА	8

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТИРОКСИНУ В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «Т4-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «Т4-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації тироксину у сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Тироксин (Т4) та 3,5,3'-трийодтиронін (Т3) - гормони, що виробляються щитоподібною залозою та циркулюють в крові як у вільній так і в зв'язаній формі - в основному, з тироксин-зв'язуючим глобуліном (ТЗГ). Гормональною активністю характеризуються тільки вільні Т3 і Т4, проте їх частка дуже мала: 0.03% від загального вмісту для Т4 і 0.3% - для Т3. Концентрація Т4 в сироватці крові - найбільш загальноприйнятій показник функції щитовидної залози, що дозволяє досить чітко розмежовувати гіпер-, гіпо- і еутіроз. Підвищення вмісту загального Т4 спостерігається при гіпертиреозі, при пухлинах гіпофіза, при станах з підвищеним рівнем ТЗГ (вагітність, гострий або хронічний активний гепатит, естрогенсекретуючі пухлини або прийомі естрогенів, генетично обумовлене підвищення), при прийомі оральних контрацептивів, героїну, метадону, тиреоїдних препаратів, ТТГ, тиреоліберину. Зниження вмісту загального Т4 спостерігається при гіпотиреозі, пангіполіуїтаризмі, станах зі зниженим рівнем ТЗГ (акромегалія, нефротичний синдром, гіпопротеїнемія, хронічні захворювання печінки, андрогенсекретуючі пухлини або прийом андрогенів, генетично обумовлене зниження), гемолізі, фізичному навантаженні, при прийомі аміносаліцилової і ацетилсаліцилової кислот, глюкокортикоїдів, сульфаніламідів, холестираміну, резерпіну, йодиду калію, трийодтироніну.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення тироксину ґрунтується на використанні конкурентного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі моноклональні антитіла проти Т4. Тироксин із зразка конкурує з кон'югованим Т4 за зв'язування з антитілами на поверхні лунки. У результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою комплекс, що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина в лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації тироксину в досліджуваному зразку. Концентрацію тироксину в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту тироксину в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність. Перехресна реакція мишачих моноклональних антитіл проти Т4 з іншими аналітами наведена в таблиці:

Аналіт	Перехресна реакція, %
L-тироксин	100
D-тироксин	30
Т3	0.5

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту Т4 у тому самому зразку сироватки (плазми) крові з використанням Набору «Т4-ІФА» не перевищує 8%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації Т4 у зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, що не містить Т4, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 32–320 нмоль/л і складає $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» – відповідність вимірної концентрації Т4 підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки та калібрувальної проби 64 нмоль/л. Відсоток «відкриття» складає 90– 110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «Т4-ІФА» концентрація Т4 у сироватці (плазмі) крові не перевищує 3 нмоль/л.

4. СКЛАД НАБОРУ

Код компонента	Символ	Найменування	Кількість	Од.	Опис
1	R212Z	SORB MTP	1	шт.	-
2	C212Z	CAL 1-5	5	шт	прозорі рідини червоного кольору (калібрувальна проба С1 – прозора безбарвна рідина
3	Q212Z	CONTROL	1	шт	прозора безбарвна рідина
4	T212Z	CONJ HRP	1	шт	прозора рідина червоного кольору
5	R055Z	SUBS TMB	1	шт	прозора безбарвна рідина
6	S008Z	BUF WASH 26X	1	шт	прозора безбарвна рідина
7	R050Z	STOP	1	шт	прозора безбарвна рідина
8	N003	-	2	шт	-
9	K212I	-	1	шт	-
10	K212Q	-	1	шт	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

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

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потрапленні на шкіру і 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 обладнання, 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. 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, перед стерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я».

5.6. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

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 $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що 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 та досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

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

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «Т4-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25 °С не довше ніж 15 діб.

Допускається одноразове заморожування (-20°C) калібрувальних проб та контрольної сироватки в аліквотах.

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

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

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності Набору;

- кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності Набору;

- калібрувальні проби та контрольну сироватку, після відкриття флаконів, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;

- концентрат розчину для відмивання, що залишився невикористаним, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності;

- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб;

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

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. У разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) крові необхідно зберігати при -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищенні) значення.

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

8.7. Не слід використовувати компоненти з інших наборів або з аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стріпів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків у двох повторях і 14 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Внесіть у відповідні лунки у двох повторях по 25 мкл калібрувальної проби та контрольної сироватки. В лунки, що залишилися, внесіть у двох повторях 25 мкл досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв.
3	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
4	Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 60 хвилин при температурі +37°C.
5	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів. При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п. 7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаліть рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченню відмивання необхідно ретельно видалити залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
6	Внесіть в усі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2–3 хв. Інкубуйте планшет у темряві при кімнатній температурі (+18...+25°C) протягом 10–20 хвилин, в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
7	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
8	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.
9	Побудуйте у напівлогарифмічних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – десятичний логарифм концентрації T4 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.
10	Прирівняйте концентрацію калібрувальної проби С1 до несуттєво малої величини, наприклад 0.01 н/моль. Визначте за калібрувальним графіком вміст T4 у досліджуваних зразках.

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Примітка: значення концентрацій Т4 у досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (3.0 нмоль/л), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (320 нмоль/л), треба проводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку Х концентрація Т4 нижча за 3.0 нмоль/л» або «вища за 320 нмоль/л».

Досліджувана група	Одиниці нмоль/л		Одиниці дод. мкг/дл	
	Нижня межа	Верхня межа	Нижня межа	Верхня межа
здорові донори	60	160	4.7	12.4
Чоловіки				
старше 61 року	60	129	4.7	10.0
Жінки				
старше 61 року	70	135	5.4	10.5
Діти				
1-5 років	90	190	7.0	14.7
6-10 років	83	170	6.4	13.2
>10 років	60	160	4.7	12.4

11. ЛІТЕРАТУРА

1. Helfand M et al. Screening for thyroid disease. Ann Intern Med 1990; 112:840.
2. Chopra, I.J. et al. A Radioimmunoassay of Thyroxine. J. Clinical Endocrinol. 1971; 33:865.
3. Young, D.S. et al. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Clinical Chemistry 1975; 21: 3660.
4. Sterling, L. Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease, Cleveland , CRC Press, P. 19 51 (1975).
5. Surks M.I. et al. American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders. JAMA 1990; 263:1529.

З питань якості Набору «Т4-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 Еліна Володимирівна