

**УТВЕРЖДАЮ**

**Заместитель генерального директора  
ООО «Научно-производственное  
объединение «Диагностические системы»**

**О.Н. Шлюндин**

**2012 г.**



**И Н С Т Р У К Ц И Я**  
**по применению набора реагентов**  
**«ДС-ИФА-Тиронид-ТЗсвободный»**

**Тест-система иммуноферментная для количественного определения  
свободного трийодтиронина**

**1. Назначение**

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-Тиронид-ТЗсвободный» предназначен для количественного определения свободного трийодтиронина (ТЗсв) в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Трийодтиронин — тироидный гормон с молекулярным весом 650 Да, является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. ТЗ циркулирует в крови в свободной и связанной (с тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), тироксинсвязывающим преальбумином и альбумином) формах. Гормональной активностью обладает только свободный ТЗ, хотя его доля очень мала – 0,3% от общего содержания ТЗ. Количественное определение концентрации свободного ТЗ в крови проводят для дифференциальной диагностики заболеваний щитовидной железы (тиреотоксикоз, тиреоидит), для подтверждения диагноза у больных с симптомами тиреотоксикоза без повышения (или с незначительным повышением) тироксина (Т4), при бессимптомном повышении общего Т4, для дифференциальной диагностики нетиреоидных заболеваний.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 41 неизвестная проба, одна проба контрольной сыворотки, пять стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора при одновременном использовании всех стрипов планшета (всего 96 определений).

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех калибровочных проб при каждой постановке.

**2. Характеристика набора**

**2.1. Принцип действия.**

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. При добавлении исследуемого образца и конъюгата ТЗ-пероксидаза во время инкубации эндогенный ТЗ сыворотки крови конкурирует с ТЗ, входящим в состав конъюгата, за связывание с моноклональными антителами к ТЗ, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами конъюгата ТЗ-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству свободного ТЗ в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ - Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата ТЗ-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация свободного ТЗ в исследуемых образцах.

## 2.2. Состав набора реагентов «ДС-ИФА-Тирод-ТЗсвободный»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к трийодтирону.	1 шт.
Конъюгат - трийодтиронин (ТЗ), меченный пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая ярко-розового цвета жидкость. В качестве консерванта содержит 0,1% проклин 300.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4 – стандартные калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества свободного ТЗ. Прозрачные или слегка опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости. Значения концентраций трийодтиронина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержат: 0,1% проклин 300, 0,01% тимеросал, 0,1% фенол.	5 флаконов по 0,5 мл
Контрольная сыворотка - сыворотка с известным содержанием свободного ТЗ. Прозрачная или опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость. Значение концентрации трийодтиронина в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержит: 0,1% проклин 300, 0,01% тимеросал, 0,1% фенол.	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат х 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор - прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент/0,2М - серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
Бланк для построения калибровочной кривой	1 шт.
Инструкция по применению	1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов;
- одноразовые наконечники;
- пластиковые ванночки для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или полиэтиленовый пакет с замком.

### 3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация свободного ТЗ в сыворотке крови человека составляет 0,3 пг/мл.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения свободного ТЗ в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.3. Специфичность. Кросс-реактивность с близкородственными реагентами указана в таблице 2.

Таблица 2

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
Трийодтиронин	100
L-тироксин	0,0006
дийодтиронин	0,0001
тетрайодтироацетат	0,00001

3.4. Клиническая проверка. Концентрацию свободного ТЗ измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч у 250 здоровых людей в возрасте от 21 до 50 лет. Средняя концентрация ТЗ свободного составила 3,2 пг/мл (от 1,2 до 4,2 пг/мл). При беременности значения ТЗ свободного могут быть отличными от нормальных.

Правила пересчета результатов:

$$\text{пмоль/л} \times 0,651 = \text{пг/мл}; \text{пг/мл} \times 1,536 = \text{пмоль/л}.$$

3.5. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций свободного ТЗ, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

#### **4. Меры предосторожности**

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

4.1. Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой от 18 до 24 °С.

4.2. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:

- неспецифических компонентов (ПР (концентрат x 25), ТМБ-Субстратный раствор, Стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах для исследования гормонов и онкомаркеров, производства ООО «НПО «Диагностические системы».

4.3. Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.

4.4. Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.

4.5. Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгата.

4.6. Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.

4.7. Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгата или субстрата.

4.8. Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.

4.9. Промывка лунок - важный этап проведения анализа: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются раствором. Не следует допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.

4.10. Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.

4.11. Необходимо использовать только валидированные дозаторы и оборудование.

4.12. Нельзя изменять процедуру проведения анализа.

4.13. Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

#### **5. Инструкция по безопасности**

5.1. Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.

5.2. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении калибраторов и контрольной сыворотки, не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ-1,2, антиген вируса гепатита В (HBsAg), p24 ВИЧ-1 и антитела к возбудителю сифилиса.

5.3. В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.

5.4. Нельзя пипетировать ртом.

5.5. При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.6. При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами и реагентами, необходимо обращаться как с инфекционными материалами.


5.7. При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.

5.8. Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезинфицировать поверхность 3 % раствором хлорамина Б.

5.9. Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

5.10. После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % синтетического моющего средства или в 3 % раствор хлорамина Б. Длительность дезинфекции – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дезинфицирующего средства. Твёрдые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см<sup>2</sup> (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см<sup>2</sup> (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70 % этиловым спиртом.



5.11.  Некоторые реагенты содержат 0,1% проклин 300. Проклин 300 0,1% - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

## **6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:**

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью от 500 до 800 об/мин при комнатной температуре;
- устройство для промывания планшетов (вошер);
- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## 7. Анализируемые образцы сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Недопустимо использование образцов с добавлением азидата натрия в качестве консерванта!** Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8°C не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20°C (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8°C.

## 8. Подготовка реагентов для анализа

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре.

8.1. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут!**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать с помощью скрепки для фольгированного пакета (не удаляя осушитель!). Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. Или поместить вскрытый фольгированный пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком.

8.2. ПР - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл воды). Полученный раствор тщательно перемешать.

8.3. Конъюгат – готов к применению. Перед использованием отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

8.4. Стандартные калибровочные пробы - готовы к применению.

8.5. Контрольная сыворотка - готова к применению.

8.6. ТМБ – Субстратный раствор – готов к применению.

8.7. Стоп-реагент - готов к применению.

## 9. Проведение анализа

9.1. Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

В остальные лунки внести дозатором по 25 мкл исследуемых сывороток в дубликатах. **Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!**

9.2. Во все лунки, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата, стрипы планшета закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать на шейкере в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин.

9.3. По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в ёмкость для сбора инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить

остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

9.4. Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора, выдержать от 20 до 30 мин в темноте при комнатной температуре.

9.5. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

**9.6. Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-Тирод-ТЗсвободный» на автоматических ИФА-анализаторах.** Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длинах волн 540 (550) нм, критерий: ОП > 0,500.

## 10. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм с настройкой прибора по «воздуху».

## 11. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках с контролем ТМБ-Субстратного раствора не превышает 0,2.

Необходимо построить калибровочный график по средним величинам ОП «Калибратора 0»; «Калибратора 1»; «Калибратора 2»; «Калибратора 3»; «Калибратора 4». На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации свободного ТЗ, выраженной в пг/мл, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят плавную калибровочную кривую.

Для обчета результатов также возможно использовать построенный в системе координат "Logit-Log" график зависимости Logit (B/B0) от логарифма (LN) концентрации свободного ТЗ в калибровочных пробах, где B – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, B0 – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу 0. Logit (B/B0) рассчитывается как  $LN((1-B/B0)/(B/B0))$ .

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций свободного ТЗ в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации свободного ТЗ в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

## 12. Ограничения теста

12.1. Все реагенты набора предназначены для определения свободного трийодтиронина в сыворотке крови человека. Набор не предназначен для определения трийодтиронина в слюне, плазме и других образцах человеческого или животного происхождения.

12.2. При использовании двух и более планшетов, рекомендуется ставить калибровочные пробы при каждой постановке.

12.3. Нельзя касаться дна лунок.

12.4. Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах данного теста. Например, наличие гетерофильных антител у пациентов, соприкасающихся с животными, может оказывать влияние на результаты иммунологических тестов. В диагностических целях результаты должны обязательно использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тестами.

12.5. Разнообразные лекарства, которые могут повлиять на связывание ТЗ с белками-носителями тироидных гормонов или на их метаболизм, затрудняют интерпретацию результатов тестирования на ТЗсвободный. Случаи серьезных нетироидных заболеваний (НТЗ) также могут вызывать сложности в оценке результатов определения свободного ТЗ. В этих случаях может быть рекомендовано исследование на ТТГ с использованием набора «ДС-ИФА-Тироид-ТТГ» (кат № ТН-351), изготовленного в ООО «НПО «Диагностические системы».

12.6. В редких случаях, таких как наследственная альбумин-недостаточная гипертироксинемия, прямое исследование ТЗ может давать неверные результаты.

12.7. Циркулирующие антитела к ТЗ могут влиять на результаты теста.

### **13. Условия хранения и эксплуатации набора**

13.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 18 месяцев.

13.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20°С не более 10 суток.

13.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

- ПР (концентрат х 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8°С;

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при комнатной температуре или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.

- Конъюгат – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Стандартные калибровочные пробы - после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.






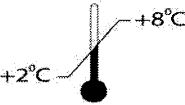



- ТМБ-Субстратный раствор – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности тест-системы при температуре от 2 до 8°С.

13.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

#### 14. Объяснение символов

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Смотрите инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

Директор по производству

ООО «Научно-производственное объединение  
«Диагностические системы»

  
В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО

Зав.кафедрой клинической  
лабораторной диагностики  
ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России  
д.м.н, профессор



  
В.В. Долгов

Подпись \_\_\_\_\_  
удостоверяю:  
Специалист по кадрам \_\_\_\_\_  
Подпись \_\_\_\_\_  
" \_\_\_\_ " \_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ года