

## ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення вільного трийодтироніну

### «Т<sub>3</sub> вільний–БЕСТ»

#### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «Т<sub>3</sub> вільний–БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення концентрації вільного трийодтироніну у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «Т<sub>3</sub> вільний–БЕСТ» рекомендований для проведення аналізу в дублікатах 40 невідомих, 6 калібрувальних проб, однієї проби контрольної сироватки й однієї проби для визначення оптичної густини розчину тетраметилбензидину (ТМБ) при використанні всіх стрипів одночасно. У випадку дробового застосування необхідна обов'язкова постановка всіх каліброваних проб для кожного окремого аналізу

#### 2. СКЛАД НАБОРУ

- **планшет** полістирольний з іммобілізованими моноклональними антитілами до Т<sub>3</sub> - 1 шт.;
- **кон'югат** Т<sub>3</sub> з пероксидазою – 1 фл.;

#### Калібрувальні проби (КП)

- **КП 1** (калібрувальна проба №1) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 0 пмоль/л ВТ<sub>3</sub>;
- **КП 2** (калібрувальна проба №2) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 1,63 пмоль/л ВТ<sub>3</sub>;
- **КП 3** (калібрувальна проба №3) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 3,6 пмоль/л ВТ<sub>3</sub>;
- **КП 4** (калібрувальна проба №4) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 6,3 пмоль/л ВТ<sub>3</sub>;
- **КП 5** (калібрувальна проба №5) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 10,2 пмоль/л ВТ<sub>3</sub>;
- **КП 6** (калібрувальна проба №6) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 60 пмоль/л ВТ<sub>3</sub>.

**Увага!** точні номінали калібрувальних проб зазначені на етикетках флаконів і в паспорті до набору реагентів.

- **КС** (контрольна сироватка) містить відому кількість ВТ<sub>3</sub>, діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону – 1 флакон;
- **РРС** (Розчин для розведення) – 1 фл.;
- **Промиваючий розчин**, концентрований водно-сольовий розчин для промивання – 3 фл.;
- **СР** (стоп-реагент) – 1 фл.;
- **ТМБ** (розчин тетраметилбензидину) – 1 фл.,

#### 3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

**3.1. Чутливість.** Мінімальна не перевищує 0,5 пмоль/л.

**3.2. Специфічність.** Перехресна реакція моноклональних антитіл до Т<sub>3</sub> з іншими тироїдами наведена в табл. 1.

Таблиця 1.

<b>ТИРОЇД</b>	<b>Перехресна реактивність, %</b>
Трийодтиронін	100%
Тироксин	Менш 0,1%
Дийодтиронін	Менш 0,1%
Реверсивний трийодтиронін	Менш 0,1%

Така аналітична специфічність обумовлює достатню діагностичну ефективність дослідження для використання в алгоритмі диференціальної діагностики захворювань щитовидної залози.

**3.3. Діапазон очікуваних значень.** В нормі у дорослих 2,5 – 7,5 пмоль/л.

#### 4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не піпетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

#### 5. ОБЛАДНАННЯ Й МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ:

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5- 3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

## 6. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ.

Узяття крові для аналізу слід проводити з використанням стандартних процедур для венозної крові, а зразки сироватки повинні бути звільнені від клітин крові центрифугуванням. Після центрифугування сироватка крові повинна бути перенесена в окрему пробірку. Слід уникати використання в аналізі плазми крові, гемолізованої, мутної або гіперліпемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

## 7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ.

### 7.1 . Підготовка реагентів

**7.1.1 .** Стрипи. Перед розкриттям пакет зі стрипами необхідно витримати при кімнатній температурі (+18 ... 25°C) не менше 30 хвилин. Розкрити пакет і переставити на вільну рамку необхідну кількість стрипів.

**7.1.2 .** Рідкі калібрувальні проби і контрольна сироватка готові до використання.

Для відновлення ліофілізованих калібрувальних проб та контрольної сироватки перед розкриттям флаконів легким постукуванням струсити частинки , які прилипли до стінок флаконів або до кришок . Відкрити флакони і покласти кришки перевернутими на суху поверхню. У кожний флакон з калібрувальної пробі та контрольної сироваткою внести по 0,5 мл дистильованої води і закрити кришками. Витримати флакони протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° C) без перемішування . Потім , акуратно нахилиючи і обертаючи флакони , перемішати їх вміст до повного розчинення , уникаючи піноутворення . Протягом наступних 10 хвилин витримати флакони при кімнатній температурі , періодично перемішуючи.

**7.1.3.** Кон'югат готовий до використання. Витрата кон'югату на один стрип становить 1,15 мл.

**7.1.4.** PPS готовий до використання. Витрата PPS на один стрип становить 1,0 мл.

**7.1.5.** Розчин для промивання. Необхідна кількість промивочного розчину розвести дистильованою водою в 20 разів.

#### Наприклад:

5 мл промивочного розчину + 95 мл дистильованої води. Ретельно перемішати , уникаючи піноутворення .

**7.1.6.** Розчин тетраметілбензідіна (ТМБ) готовий до використання. Витрата ТМБ на один стрип становить 1,15 мл.

**7.1.7.** Стоп - реагент готовий до використання. Витрата стоп- реагенту на один стрип становить 1,15 мл.

**7.1.8.** Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути перемішані і доведені до кімнатної температури.

### 7.2. Постановка аналізу

**7.2.1.** Скласти протокол маркування лунок. Лунки промаркувати наступним чином:

A1 , A2 - № 1 - для вимірювання величини оптичної густини розчину ТМБ ;

B1 , B2 - № 2 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 1;

C1 , C2 - № 3 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 2;

D1 , D2 - № 4 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 3;

E1 , E2 - № 5 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 4 ;

F1 , F2 - № 6 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 5;

G1 , G2 - № 7 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 6 ;

H1 , H2 - № 8 - для вимірювання величини оптичної густини контрольної сироватки

**7.2.2** У всі лунки, крім лунок A1 і A2, внести по 80 мкл PPS.

**7.2.3** Внести у відповідні лунки по 20 мкл калібрувальних проб та контрольної сироватки, в інші лунки - по 20мкл досліджуваної сироватки крові в дублікатах.

*Примітка: загальний час внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки і досліджуваних сироваток крові не повинен перевищувати 15 хвилин, інакше час інкубації різних зразків буде значно відрізнятися, що призведе до хибних результатів.*

**7.2.4** Інкубувати стрипи протягом 45 хвилин при струшуванні в термо-шейкері при температурі +37 ° C зі швидкістю 500-800 об/хв.

**7.2.5** По закінченні інкубації видалити вміст лунок в контейнер з дезінфікуючим розчином (1% розчином гіпохлориту натрію або 6% розчином перекису водню) і промити лунки 5 разів. При кожній промивці в усі лунки додати по 300 мкл розчину для промивання , приготованого за п. 7.1.6, струснути рамку на шейкері протягом 5-10 секунд з наступним декантування . Після останнього декантування ретельно видалити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стрипами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу .

Допускається промивка лунок за допомогою автоматичного промивання пристрою.

**7.2.6** У всі лунки, крім лунок A1 та A2, внести по 100 мкл кон'югату.

**7.2.7** Інкубувати стрипи протягом 15 хвилин при струшуванні в термо-шейкері при температурі +37 ° C зі швидкістю 500-800 об/хв.

**7.2.8** Після закінчення другої інкубації видалити вміст лунок Декантування і промити лунки згідно п. 7.2.5.

**7.2.9** негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ. Інкубувати стрипи в темноті при кімнатній температурі (+18 ... 25°C) протягом 15-30 хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення.

**7.2.10** Додати в усі лунки з тією ж швидкістю і в тій же послідовності, як і розчин ТМБ, по 100 мкл стоп- реагенту для зупинки ферментної реакції, перемішати на шейкері протягом 1-2 хвилин при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° C)

**7.2.11.** Якщо неможливо виміряти оптичну густину у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.10, тоді слід мати на увазі, що забарвлення в лунках планшета стабільна не більше 20 хвилин при температурі +18 ... 25.

## 8. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.

**8.1.** Виміряти на фотометрі вертикального сканування оптичну густину розчину в лунках при довжині хвилі 450 нм.

**8.2.** При реєстрації результату необхідно відняти значення ОГ у лунках A1 і A2 від ОГ усіх останніх лунок.

Примітка: середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках А1 та А2 не повинно перевищувати 0,09 од.ОГ

### 9. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ.

9.1. Побудувати калібрівочний графік залежності ОГ від концентрації вільного Т<sub>3</sub> (пмоль/л) в калібрівочних пробах (Малюнок). Зовнішній вигляд графіка залежить від способу перетворення вісей.

Примітка: для побудови калібрівального графіка на масштавному папері необхідно використовувати формулу 1 або 2. Якщо програма фотометра дозволяє віднімати величину ОГ в лунках А1 та А2 від значень ОГ усіх останніх лунок, то для розрахунку кожної калібрівочної або досліджуваної проби використовувати формулу (1)

$$B / B_1 \times 100\% ,$$

де **B** - значення оптичної густини в лунках, що містять калібрівальні або досліджувані проби ,

**B<sub>1</sub>** - середнє арифметичне значення оптичної густини лунки з калібрівочною пробою №1

Якщо програма фотометра не дозволяє віднімати величину ОГ в лунках А1 та А2, то використовувати формулу (2)

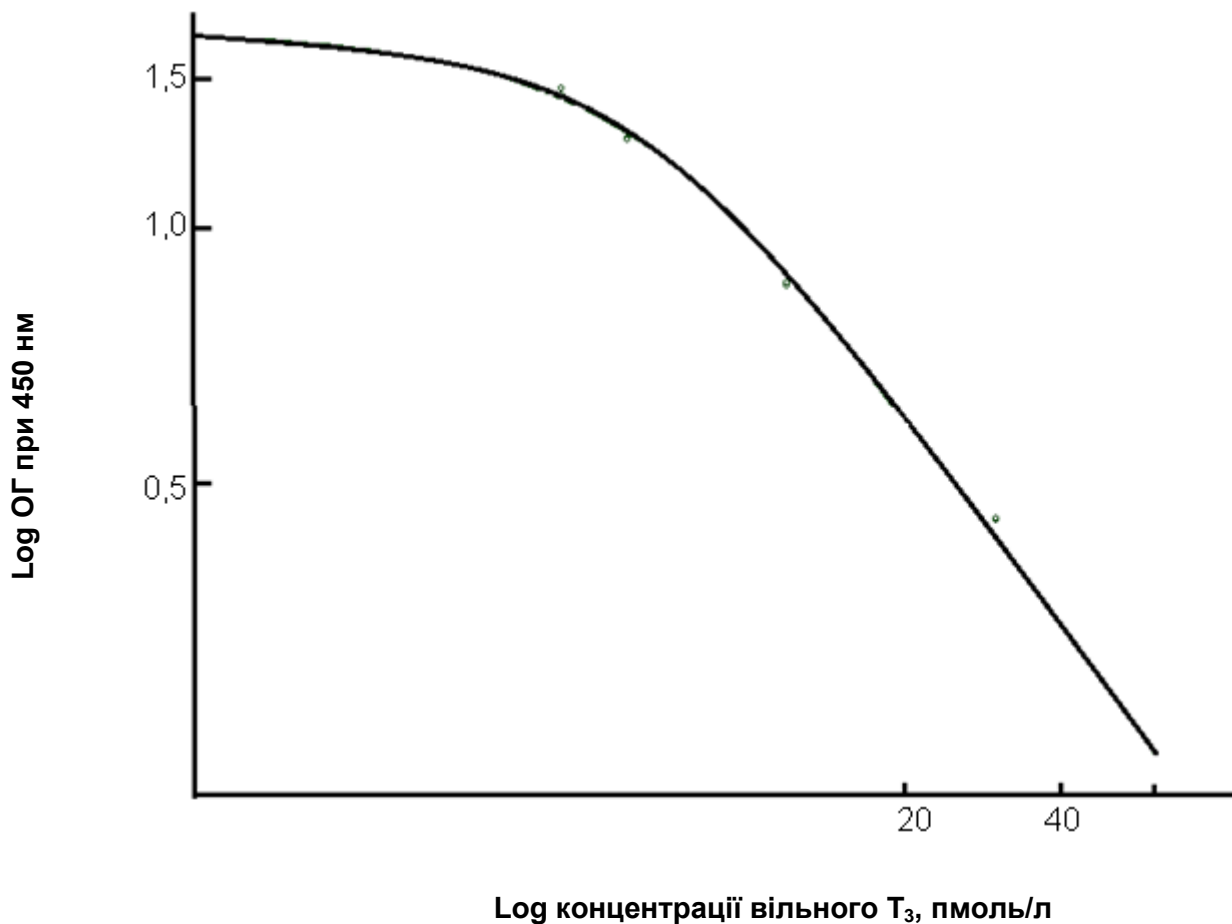
$$(B-B_T) / (B_1-B_T) \times 100\% ,$$

де **B<sub>T</sub>** - середнє арифметичне значення оптичної густини лунках А1 та А2.

9.2. Визначити зміст вільного Т<sub>3</sub> в пробах за калібрівальним графіком.

9.3. Для зразків сироватки крові з показниками ОГ вище ОГ нульового калібратора (B1) приймати значення концентрації «нижче 0,5 пмоль/л».

Екстраполяція калібрівального графіка для значень концентрації Т<sub>3</sub>, що перевищують номінал КП №6, не допускається. При наявності таких випадків приймати значення концентрації досліджуваного зразка «вище концентрації КП №6»



### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

Набір зберігати і транспортувати при (2-8)°С.

Промивочний розчин підготовлений до використання зберігати не більш 5 діб.

Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 5 діб. Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися: в ТОВ «Бест Діагностик» за адресою:

04074, м. Київ-74, вул. Лугова, 9, тел./факс: (044) 500-57-11 E-mail: [info@bestdiagnostic.com.ua](mailto:info@bestdiagnostic.com.ua)

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції

### СХЕМА ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

№	Стадія (операція)	Реагенти	Тем-ра	Час	Примітка
---	-------------------	----------	--------	-----	----------

1	Внесення реагентів	80 мкл <b>PPC</b>	+18...К Т+25°C	Внесення КП, КС не більше 15 зразків	В лунки для виявлення ОП ТМБ нічого не вносити
2		20 мкл КП і КС			
3		20 мкл досліджуваних зразків			
4	Інкубація №1	-	+37°C	45	Термостатируемый шейкер , 500-800 об/мин
5	Промивання	300 мкл в лунку 1*промивного розчина (4 рази)			1*промивного розчина==14 мл промивочного розчину +266 мл Н2О
6	Внесення кон'югату	100 мкл кон'югату	КТ		В лунки для визначення ОГ ТМБ кон'югат не вносить
7	Інкубація №2		+37°C	15	Термостатируемый шейкер , 500-800 об/мин
8	Промивання	300 мкл в лунку 1*промивного розчина (4 рази)			1*промивного розчина==14 мл промивочного розчину +266 мл Н2О
9	Внесення хромогена	100 мкл ТМБ			
10	Інкубація с ТМБ	-	КТ	15-30	В темноті
11	Зупинка ферментної реакції	100 мкл стоп-реагент			
12	Змішування		КТ	1-2	Шейкер
13	Реєстрація результатів	-		Протягом 20 після зупинки ферментної реакції	450 нм
14	Обробка результатів				Калькулятор і масштабний папір / відповідне ПЗ

**Примітки:**

**КП - калібрувальна проба;**

**КС - контрольна сироватка;**

**ОГ - оптична густина;**

**КТ - кімнатна температура (+18 ... 25 ° C);**

**ПЗ - програмне забезпечення.**