

## ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення антигену вільного тироксину  
«Т<sub>4</sub> вільний–БЕСТ»

### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «Т<sub>4</sub> вільний–БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення концентрації вільного тироксину у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «Т<sub>4</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>4</sub> - 1 шт.;
- **кон'югат** Т<sub>4</sub> з пероксидазою – 1 фл.

**Калібрувальні проби (КП): 6 флаконов**

- КП№1**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 0 пмоль/л Т<sub>4</sub> вільного,
- КП№2**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 3 пмоль/л Т<sub>4</sub> вільного,
- КП№3**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 6 пмоль/л Т<sub>4</sub> вільного,
- КП№4**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 12 пмоль/л Т<sub>4</sub> вільного,
- КП№5**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 30 пмоль/л Т<sub>4</sub> вільного,
- КП№6**- 1 флакон, 0,5 мл, містить 100 пмоль/л Т<sub>4</sub> вільного,

**Промиваючий розчин**, концентрований водно-сольовий розчин для промивання лунок (20-кратний концентрат).

**1 флакон** (14 мл);

**ТМБ (Розчин тетраметилбензидина) 1 флакон** (14 мл);

**Стоп-реагент 1 флакон** (14 мл);

**КС (контрольна сироватка)** містить відому кількість Т<sub>4</sub> вільного, діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону. **1 флакон**

### 3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

**3.1. Чутливість.** Мінімальна вірогідно обумовлена набором концентрація Т<sub>4</sub> вільного у сироватці крові людини не перевищує 1,0 пмоль/л.

**3.2. Специфічність.** Перехресна реакції моноклональних антитіл до Т<sub>4</sub> з іншими тироїдами наведена в Табл. 1.

Таблиця 1.

<b>ТИРОЇД</b>	<b>Перехресна реактивність, %</b>
Тироксин	100%
Трийодтиронін	Менш 0,5%
Реверсивний трийодтиронін	Менш 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 10 – 23 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 пікетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

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

Спектрофотометр 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.

**6.1.** 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.

**6.2.** Слід уникати використання в аналізі плазми крові, гемолізованої, мутної або гіперліпемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

**6.3.** Зразки сироватки крові слід використати протягом 24 годин з моменту отримання за умови їх зберігання при +2...+8°C. Для більш тривалого зберігання зразки необхідно заморозити при температурі нижче -20°C. Уникати повторного заморожування зразків.

## **7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗІВ**

### **7.1 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ.**

**7.1.1.** Стрипи. Перед відкриттям пакет із стріпами необхідно витримати при кімнатній температурі (+18...+25 °С) не менше 30 хвилин. Розкрити пакет і переставити на вільну рамку необхідну кількість стрипів. Залишок упакувати у фольгований пакет та зберігати до кінця терміну придатності при +2...+8°C.

Рідкі калібрувальні проби і контрольна сироватка готові до використання.

**7.1.2. Кон'югат** готовий до використання. Витрата кон'югата на один стріп складає 1,5 мл

**7.1.3. Промиваючий розчин.** Необхідну кількість розчину розвести дистильованою водою в 20 разів.

*Наприклад:* 5 мл промиваючого розчину+ 95 мл води. Ретельно перемішати, уникаючи піноутворення.

**7.1.4.** Розчин тетраметілбензидину (ТМБ) готовий до використання. Витрата ТМБ на один стріп складає 1,15 мл

**7.1.5.** Стопи-реагент готовий до використання. Витрата стоп-реагенту на один стріп складає 1,15 мл

**7.1.7.** Всі реагенти перед проведенням аналізу мають бути ретельно перемішані і доведені до кімнатної температури (+18...+25 °С).

### **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.** Внести у відповідні лунки по 20 мкл калібрувальних проб та контрольної сироватки, усі інші лунки – по 20 мкл досліджувані 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 неправильних результатів .

**7.2.3.** У всі лунки, крім лунок A1 і A2, внести по 150 мкл кон'югату.

**7.2.4. Інкубувати стріпи протягом 60 хвилин при струшуванні в термостатуємому 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 п'ять разів. При кожній промивці в усі лунки додавати по 300 мкл розчину для промивання, приготованого за п. 7.1.5, Струснути рамку на шейкері протягом 5-10 секунд з наступним декантіруванням. Після останнього декантірування ретельно видалити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стріпами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу . Допускається промивка лунок за допомогою автоматичного промивання пристрою.

**7.2.6.** негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ. Інкубувати стріпи в темноті при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) протягом 15 хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення або 10 хвилин у термостатуємому шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об / хв.

**7.2.7.** 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 ° С )

**7.2.8.** Якщо неможливо виміряти оптичну густина у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.7., то слід мати на увазі , що забарвлення в лунках планшета стабільна не більше 20 хвилин при кімнатній температурі. *Примітка:* максимальна оптична густина не повинна перевищувати меж лінійного виміру спектрофотометра. Робочий діапазон спектрофотометра необхідно уточнювати в паспорті приладу. Рекомендована максимальна оптична густина не більше 2,5 од. ОГ.

## **8. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.**

**8.1.** Виміряти на фотометрі вертикального сканування ОГ розчину в лунках при довжині хвилі 450 нм. *Примітка:* середнє арифметичне значення ОГ в лунках A1 та A2 не повинно перевищувати 0,09 од. ОГ.

## **9. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ.**

**9.1.** Побудувати калібрувочний графік залежності ОГ від концентрації вільного T<sub>4</sub> (пмоль/л) в калібрувочних пробах (Малюнок). Зовнішній вигляд графіка залежить від способу перетворення вісей.

*Примітка:* для побудови калібрувального графіка на масштабному папері необхідно використовувати формулу 1 або 2. Якщо програма фотометра дозволяє віднімати величину ОГ в лунках A1 та A2 від значень ОГ усіх останніх лунок, то для розрахунку кожної калібрувочної або досліджуваної проби використовувати формулу (1)

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

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

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

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

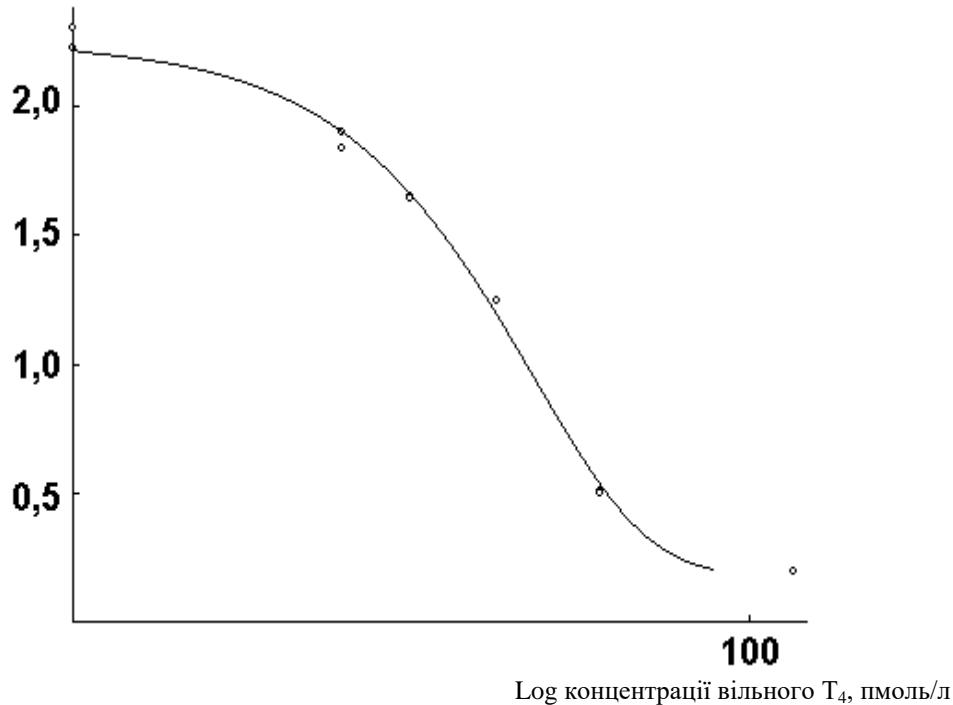
$$(B-B_T) / (B_1-B_T) \times 100\% ,$$

де  $B_T$  - середнє арифметичне значення оптичної густини лунках А1 та А2.

**9.2.** Визначити зміст вільного Т4 в пробах за калібрувальним графіком.

**9.3.** Для зразків сироватки крові з показниками ОГ вище ОГ нульового калібратора (В1) приймати значення концентрації «нижче 1,0 пмоль/л».

Екстраполяція калібрувального графіка для значень концентрації Т4 , що перевищують номінал КП №6, не допускається. При наявності таких випадків приймати значення концентрації досліджуваного зразка «вище концентрації КП №6»



## 10. ОБМЕЖЕННЯ ПРИ ПРОВЕДЕННІ АНАЛІЗУ.

**10.1.** При використанні набору для проведення декількох незалежних серій аналізів необхідно мати на увазі, що кількість незалежних експериментів обмежене об'ємом калібрувальних проб. Для кожного незалежного експерименту наполегливо рекомендується побудова нового каліброваного графіка й визначення концентрації аналіту в контрольній сироватці. Не допускається використання реагентів різних серій та інших фірм-виробників.

**10.2.** При інтерпретації результатів дослідження слід пам'ятати, що:

- До зменшення концентрації  $BT_4$  можуть приводити захворювання надниркової залози з підвищеним викидом кортизолу, пухлини гіпофізу зі зниженням продукції його гормонів, а також значний дефіцит йоду в організмі. Тривале приймання кортикостероїдів (преднізолон і ін.), сульфаніламідних препаратів може також приводити до дефіциту  $T_4$ .

## 11. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ Й ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ.

Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Промиваючий розчин підготовлений до використання зберігати не більш 30 діб при (2-8)°С.

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

Таблиця.

№	Стадія	Реагенти	Температура	Час	Примітка
1	Внесення реагентів	20 мкл КП і КС	КТ	Внесення КП,КС не більше 15 досліджуваних зразків	В лунки для виявлення ОГ ТМБ нічого не вносити
2		20 мкл досліджуваних зразків			
3		150мкл кон'югату			
4	<b>Інкубація</b>	-	+37°C	60	Термо- шейкер , 500-800 об/хв.
5	Промивка	300 мкл в лунку 1*промивного розчина (4 рази)			1*промивного розчина==14 мл промивочного розчину+266 мл H <sub>2</sub> O
6	Внесення хромогена	100 мкл ТМБ			
7	<b>Інкубація з ТМБ</b>	-	КТ	15-30	В темноті
8	Зупинка ферментної реакції	100 мкл стоп-реагент			
9	Змішування	-	КТ	1-2	Шейкер
10	Реєстрація результатів	-		Протягом 20 після зупинки ферментної реакції	Фотометр, 450 нм
11	Обробка результатів	-			Калькулятор і масштабний папір /відповідно ПЗ

**Примітка до таблиці:****КП - калібрувальна проба;****КС - контрольна сироватка;****ОГ - оптична густина;****RT - кімнатна температура (+18 ... 25 ° C);****ПЗ - програмне забезпечення.**