«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации свободной фракции трийодтиронина в сыворотке крови

(Т3 свободный-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации свободной фракции трийодтиронина в сыворотке крови человека «$Т_3$ свободный-ИФА-БЕСТ» предназначен для определения концентрации свободной фракции трийодтиронина ($Т_{3\ св}$) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Трийодтиронин – тироидный гормон с молекулярным весом 651 Да. Трийодтиронин является одним из гормонов, синтезируемых щитовидной железой. В сыворотке крови гормон находится преимущественно в комплексе с транспортными белками, доля не связанного – свободного гормона составляет примерно 0,2% от общей концентрации $Т_3$.

1.3. Количественное определение содержания $Т_{3\ св}$ в сыворотке крови может быть использовано для оценки функционального состояния щитовидной железы.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного, 6 калибровочных образцов, 1 контрольного образца, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением поликлональных антител к трийодтиронину. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит конкурентное связывание свободной фракции сывороточного трийодтиронина и трийодтиронина, конъюгированного с пероксидазой, с поликлональными антителами к трийодтиронину, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации $Т_{3\ св}$ в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основа-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

нии калибровочного графика рассчитывается концентрация $T_{3\ св}$ в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов «ломающихся» по одной лунке) с иммобилизованными поликлональными антителами к трийодтиронину, готовый для использования – 1 шт.;

– калибровочные образцы, аттестованные относительно Certified Reference Material IRMM-469, содержащие известные количества $T_{3\ св}$ – 0; 1,25; 2,5; 5; 10 и 20 пмоль/л; концентрации $T_{3\ св}$ в калибровочных образцах могут отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,7 мл);

– контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека, с известным содержанием $T_{3\ св}$, аттестованный относительно Certified Reference Material IRMM-469, готовый для использования – 1 флакон (0,7 мл);

– конъюгат трийодтиронина с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);

– раствор тетраметилбензидина плюс, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:

– пленка для заклеивания планшета – 1 шт.;

– ванночка для реагента – 2 шт.;

– наконечники для дозаторов на 2-200 мкл – 16 шт.;

– трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемые в наборе поликлональные антитела обеспечивают высокую специфичность выявления $T_{3\ св}$. Не обнаружено перекрестной реакции поликлональных антител с тироксином (до 4 нг/мл) и дийодтиронином (до 60 нг/мл).

3.2.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации $T_{3\ св}$ в контрольном образце не превышает 8%.

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации $T_{3\ св}$ при разведении калибровочных образцов, содержащих 20; 10; 5 и 2,5 пмоль/л $T_{3\ св}$, в 2 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации $T_{3\ св}$ предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца с концентрацией $T_{3\ св}$ 2,5 пмоль/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация $T_{3\ св}$, рассчитанная на основании среднего арифметического значения концентрации калибровочного образца B_0 минус 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 0,5 пмоль/л.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация $T_{3\ св}$, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 110 здоровых мужчин и женщин в возрасте 20-50 лет, находилась в диапазоне 4,0 ÷ 8,6 пмоль/л.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации $T_{3\ св}$, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

3.8. Хук-эффект высоких концентраций не был обнаружен вплоть до концентрации $T_{3\ св}$ 80 пмоль/л.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Стоп-реагент и раствор тетраметилбензидина плюс обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора тетраметилбензидина плюс на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды. Конъюгат содержит проклин 150.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание с частотой 600-800 об/мин и температуре 37±1 °С;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

– дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– флаконы вместимостью 15 мл;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать сыворотку крови.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа вскрыть упаковку набора, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Выдержать все компоненты и анализируемые образцы сывороток крови при температуре от 18 до 25°С не менее 30 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности набора.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка, установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с осушителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Промывочный раствор приготовить разведением концентрата фосфатно-солевого буферного раствора в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца.

Калибровочные и контрольный образцы готовы для использования и не требуют дополнительного разведения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов для использования.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в чистый флакон или ванночку для реагента внести необходимое количество конъюгата.

Утилизировать конъюгат, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Таблица расхода компонентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.6. Подготовка раствора ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс готов для использования.

Исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ плюс. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в чистый флакон или ванночку для реагента.

Утилизировать раствор ТМБ плюс, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ плюс необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ плюс, нельзя отмывать с при-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

менением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ плюс в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.7. Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 50 мкл каждого калибровочного образца и по 50 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 50 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Время внесения образцов не должно превышать 10мин при использовании всех лунок планшета.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл коньюгата (см. п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать флакон или ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37±1 °С.

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл промывочного раствора в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.6).

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать флакон или ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37±1°С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.5. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ плюс, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8.6. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм-655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации $T_{3\ св}$ в калибровочных образцах (пмоль/л).

9.3. Определить содержание $T_{3\ св}$ в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.4. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации $T_{3\ св}$ в контрольном образце соответствует диапазону концентраций, указанному на этикетке флакона.

9.5. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации $T_{3\ св}$ в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

9.6. Для предоставления результатов измерений концентрации $T_{3\ св}$ в пг/мл, следует использовать коэффициент пересчета 0,651 (1 пг/мл = 0,651 пмоль/л).

Примечание: наличие в образцах сыворотки крови свободного гемоглобина в концентрации до 4,6 г/л; билирубина в концентрации до 1,8 мг/дл и триглицеридов в концентрации до 1,19 г/л не оказывает интерферирующего влияния на результаты иммуноферментного определения концентрации свободной фракции трийодтиронина.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не бо-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лее 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора. В случае дробного использования:

– неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

– калибровочные образцы; контрольный образец; конъюгат; концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином; раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

– промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток;

10.5. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации свободного T_3 в контрольном образце.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (раствор ТМБ плюс, ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

10.7. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функцио-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

нальные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «T_3 свободный-ИФА-БЕСТ», обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru