

**УТВЕРЖДЕНА**  
Приказом Росздравнадзора

от \_\_\_\_\_ 20 г. № \_\_\_\_\_

**«УТВЕРЖДАЮ»**  
Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов  
\_\_\_\_\_ 2010 г.

## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации  
свободной фракции трийодтиронина в сыворотке крови  
(Т<sub>3</sub> свободный – ИФА – БЕСТ)

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

1.1. Набор реагентов Т<sub>3</sub> свободный-ИФА-БЕСТ предназначен для количественного определения концентрации свободной фракции трийодтиронина (Т<sub>3</sub> 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 в основном в комплексе с транспортными белками, доля не связанного – свободного гормона (Т<sub>3</sub> св.) составляет примерно 0,2% от общей концентрации Т<sub>3</sub>.

1.3. Количественное определение содержания Т<sub>3</sub> св. в сыворотке крови может быть использовано для оценки функционального состояния щитовидной железы.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

---

*Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. Директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной и с.н.с. Н.В. Мычка.*

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением поликлональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит конкурентное связывание 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  $T_3_{св}$  в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация  $T_3_{св}$  в анализируемых образцах.

### 2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными поликлональными антителами к трийодтиронину, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по «Liphocheck Immunoassay Plus Control Abbott Architect  $T_3$  free»; содержащие известные количества  $T_3_{св}$  – 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 пмоль/л; концентрации  $T_3_{св}$  в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,7 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием  $T_3_{св}$ , готовая для использования – 1 флакон (0,7 мл);
- конъюгат трийодтиронина с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- плёнка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночка для реагента – 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 5-200 мкл – 16 шт.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции поликлональных антител к  $T_3$  с тироксином и дийодтиронином.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания  $T_3$  св в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора  $T_3$  свободный - ИФА-БЕСТ не превышает 8 %.

3.3. Линейность. Зависимость концентраций  $T_3$  св в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей  $T_3$  св, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1,25-20 пмоль/л и составляет 90-110 %.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации  $T_3$  св предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 2,5 пмоль/л. Процент «открытия» составляет 90-110 %.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация  $T_3$  св 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 лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет, находилась в диапазоне 4 – 8,6 пмоль/л.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации  $T_3$  св, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

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, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных 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 набором.

## **5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:**

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре  $+37 \pm 1$  °C и 400-800 об/мин;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

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

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, с изменяемым объёмом отбора жидкостей на: 5 – 50 мкл, 50 – 350 мкл;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– колба вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– бумага фильтровальная.

## **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

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

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  не более 5 сут или при температуре минус  $20^{\circ}\text{C}$  (и ниже) не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре ( $+18-25^{\circ}\text{C}$ ).

## **7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 мин.

### **7.2. Подготовка планшета**

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности набора.

### **7.3. Приготовление промывочного раствора**

Готовится в мерном цилиндре.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре  $+30-40^{\circ}\text{C}$  до полного растворения осадка.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  не более 5 сут.

### **7.4. Подготовка калибровочных проб и контрольной сыворотки**

Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть. После вскрытия флаконов хранить при температуре  $2-8^{\circ}\text{C}$  не более 1 мес.

### **7.5. Подготовка конъюгата**

Конъюгат готов к использованию.

Допускается наличие осадка. Перед использованием встряхнуть.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в ванночку для реагента за 5-10 мин до начала постановки анализа.

Конъюгат после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2-8^{\circ}\text{C}$  не более 1 мес.

#### 7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор тетраметилбензидина плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора тетраметилбензидина плюс отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента за 5-10 мин до окончания инкубации и поместить в защищенное от света место.

Раствор тетраметилбензидина плюс после вскрытия флаконов хранить при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

Необходимо исключить воздействие света на раствор тетраметилбензидина плюс.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

| Кол-во используемых стрипов | Промывочный раствор                                                     |                           | Конъюгат, мл | Раствор тетраметилбензидина плюс, мл |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------|--------------------------------------|
|                             | 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл | Дистиллированная вода, мл |              |                                      |
| 2                           | 4,0                                                                     | 96                        | 2,0          | 2,0                                  |
| 3                           | 6,0                                                                     | 144                       | 3,0          | 3,0                                  |
| 4                           | 8,0                                                                     | 192                       | 4,0          | 4,0                                  |
| 5                           | 10                                                                      | 240                       | 5,0          | 5,0                                  |
| 6                           | 12                                                                      | 288                       | 6,0          | 6,0                                  |
| 7                           | 14                                                                      | 336                       | 7,0          | 7,0                                  |
| 8                           | 16                                                                      | 384                       | 8,0          | 8,0                                  |
| 9                           | 18                                                                      | 432                       | 9,0          | 9,0                                  |
| 10                          | 20                                                                      | 480                       | 10           | 10                                   |
| 11                          | 22                                                                      | 528                       | 11           | 11                                   |
| 12                          | 24                                                                      | 576                       | 12           | 12                                   |

7.7. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и по 50 мкл контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

7.8. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.5).

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

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре  $+37 \pm 1$  °C и 650 об/мин.

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.3), с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 5 раз. После каждой промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс (см п. 7.6).

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

Остатки раствора тетраметилбензидина плюс из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором тетраметилбензидина плюс).

7.12. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в темноте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре  $+37 \pm 1$  °C и 650 об/мин.

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

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху).

Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 20 мин.

## 9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации  $T_3_{cb}$  в калибровочных пробах (пмоль/л).

9.2. Определить содержание  $T_3_{cb}$  в контрольной сыворотке и в анализируемых пробах по калибровочному графику.

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов  $T_3$  свободный-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре  $+2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 1 месяца, но в пределах срока годности набора.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре  $+2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре  $+2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;

- раствор тетраметилбензидина плюс после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре  $+2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более 1 мес;

- калибровочные пробы, контрольную сыворотку и конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре  $+2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более 1 мес;

- промывочный раствор можно хранить при температуре  $+2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более 5 сут;

- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации  $T_{3\text{ св}}$  в контрольной сыворотке.

10.3. Для представления результатов измерений концентрации свободной фракции трийодтиронина в пг/мл следует использовать коэффициент пересчета 1,536 (1,000 пмоль/л  $T_{3\text{ св}}$  = 1,536 пг/мл  $T_{3\text{ св}}$ )

10.4. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре  $+2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более 5 сут или при температуре минус  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

10.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

По вопросам, касающимся качества набора Т<sub>3</sub> свободный-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, ЗАО «Вектор-Бест», тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383) 336-60-30, 332-67-52,

и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (499) 120-60-95; 120-60-96.

Зам. директора НИИ СД  
ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Ю. Рукавишников

Зав. лабораторией  
ЗАО «Вектор-Бест»

 Н.Н. Сорокина

Ректор СГМУ им. В.И. Разумовского  
Росздрава



В.М. Попков





Прошнуровано, пронумеровано  
и скреплено печатью  
4 листов