

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення трийодтироніну «Т₃-БЕСТ»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «Т₃-БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення концентрації трийодтироніну (Т₃) у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «Т₃-БЕСТ» рекомендований для проведення аналізу в дублях 40 невідомих, 6 калібрувальних проб, однієї проби контрольної сироватки й однієї проби для визначення оптичної густини розчину тетраметилбензидину (ТМБ) при використанні всіх стріпів одночасно. У випадку дробового застосування необхідна обов'язкова постановка всіх калібрувальних проб для кожного окремого аналізу.

2. СКЛАД НАБОРУ

Планшет полістирольний з іммобілізованими моноклональними антитілами до Т₃ - 1 шт.;

Кон'югат Т₃ з пероксидазою хрому – 1 фл., 14 мл;

Калібрувальні проби (КП): **комплект**

КП 1 (калібрувальна проба №1) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 0 нмоль/л Т₃;

КП 2 (калібрувальна проба №2) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 0,37 нмоль/л Т₃;

КП 3 (калібрувальна проба №3) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 0,74 нмоль/л Т₃;

КП 4 (калібрувальна проба №4) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 1,5 нмоль/л Т₃;

КП 5 (калібрувальна проба №5) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 2,9 нмоль/л Т₃;

КП 6 (калібрувальна проба №6) – 1 флакон, 0,5 мл, містить 8,8 нмоль/л Т₃.

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

КС (контрольна сироватка), містить відому кількість Т₃, діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону – 1 флакон, 05 мл;

Промиваючий розчин – 1 фл., 14 мл;

Розчин-Т₃ – 1 фл., 14 мл;

Стоп-реагент – 1 фл, 14 мл;

ТМБ (розчин тетраметилбензидину) – 1 фл 14 мл.,

3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

3.1. Чутливість. Мінімальна не перевищує 0,25 нмоль/л.

3.2. Специфічність. Перехресна реакції моноклональних антитіл до Т₃ з іншими тироїдами наведена в Табл. 1.

Таблиця 1.

ТИРОЇД	Перехресна реактивність, %
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 1,0 – 2,8 нмоль/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:

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 гіперглікемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗІВ

7.1 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ.

7.1.1. Стріпи. 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 стріпів.

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

7.1.3. Кон'югат готовий до використання. Витрата кон'югата на один стріп складає 1,15 мл

7.1.4. Розчин-Т₃ готовий до використання. Витрата розчину – Т₃ на один стріп складає 1,15 мл

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

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

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

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

7.1.8. 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 50 мкл калібрувальних проб та контрольної сироватки, усі інші лунки – по 50 мкл досліджувані сироватки крові в дублях.

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 100 мкл **Розчину-Т₃**.

7.2.4. У всі лунки внести по 100 мкл кон'югату

7.2.5. Інкубувати стріпи протягом 60 хвилин при струшуванні в термо- шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об / хв .

7.2.6. По закінченні інкубації видалити вміст лунок в контейнер з дезінфікуючим розчином (1% розчином гіпохлориту натрію або 6% розчином перекису водню) і промити лунки **чотири рази**. 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 декантуванням. Після останнього декантування ретельно видалити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стріпами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу . Допускається промивка лунок за допомогою автоматичного промивного пристрою.

7.2.7. негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ. Інкубувати стріпи в темноті при кімнатній температурі (+18 ... 25 ° С) протягом 15-30 хвилин в залежності від ступеня розвитку забарвлення або 10 хвилин у термо- шейкері при температурі +37 ° С зі швидкістю 500-800 об / хв.

7.2.8. 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)

7.2.9. Якщо неможливо виміряти оптичну густину у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.8., 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 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 A1 та A2 не повинно перевищувати 0,09 од.ОГ.

9. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ.

9.1. Побудувати калібрувальний графік залежності ОГ від концентрації Т3 (нмоль/л) в калібрувальних 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 калібрувальної 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_1 - середнє арифметичне значення оптичної густини лунки з калібрувочною пробою №1

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

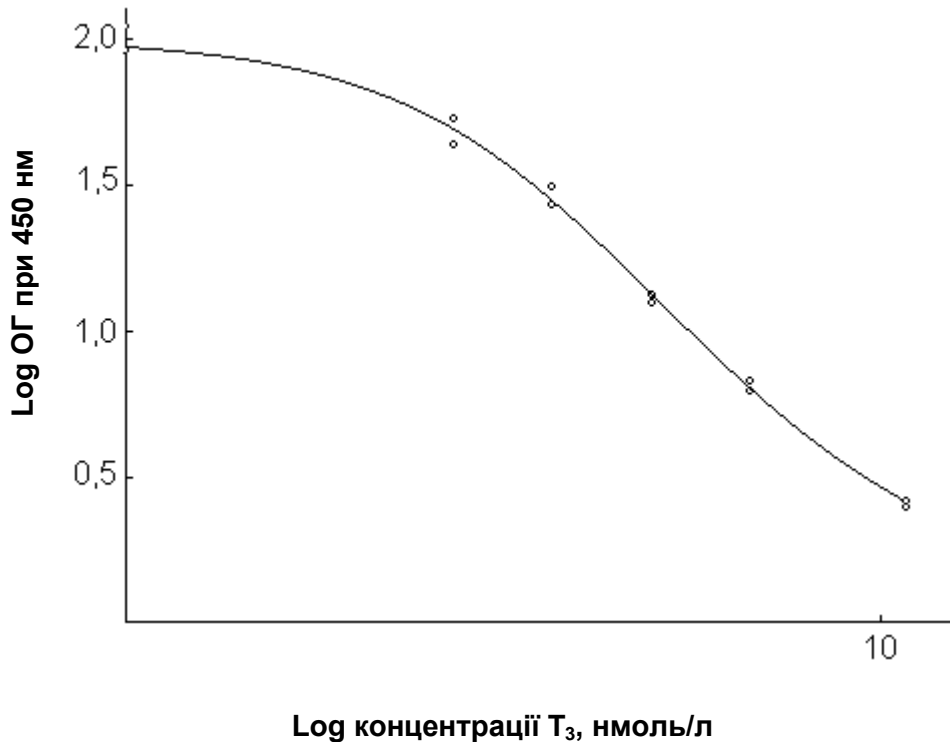
$$(B-B_T) / (B_1-B_T) \times 100\% ,$$

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

9.2. Визначити вміст Т3 в пробах за калібрувальним графіком.

9.3. Для зразків сироватки крові з показниками ОГ вище ОГ нульового калібратора (В1) приймати значення концентрації «нижче 0,25 нмоль/л».

Екстраполяція калібрувального графіка для значень концентрації Т3 , що перевищують номінал КП №6, не допускається. При наявності таких випадків приймати значення концентрації досліджувального зразка «вище концентрації КП №6»:



10. 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

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

СХЕМА ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Таблиця.

№	Стадія	Реагенти	Температура	Час	Примітка
1	Внесення реагентів	50 мкл КП і КС	КТ	Внесення КП,КС не більше 15 досліджуваних зразків	В лунки для виявлення ОГ ТМБ нічого не вносити
2		50 мкл досліджуваних зразків			
3		100 мкл розчин Т ₃			
4	Внесення кон'югату	100 мкл			
5	Інкубація	-	+37°C	60	Термо- шейкер , 500-800 об/хв.
6	Промивка	300 мкл в лунку 1*промив. розчину (4 рази)			1*промив. розчин =14 мл промив. розчину+266 мл Н ₂ О
7	Внесення хромогена	100 мкл ТМБ			
8	Інкубація з ТМБ	-	КТ	15-30	В темноті
			+37°C	10	Термо- шейкер , 500-800 об/хв
9	Зупинка ферментної реакції	100 мкл стоп-реагент			
10	Змішування	-	КТ	1-2	Шейкер
11	Реєстрація результатів	-		В перебігу 20 після зупинки ферментної реакції	Фотометр, 450 нм
12	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.