

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЗАГАЛЬНОГО ТРИЙОДИТРОНІНУ

11225-300, Rapid Triiodothyronine (Rapid T3) Test System

Каталог. №: 11225-300

Дата випуску інструкції: 01-04-2017

Кількість : 96

Версія 0

Виробник : Monobind Inc., (США)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВВЕДЕННЯ

Призначення використання: Кількісне визначення концентрації загального трийодтироніну у сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричного.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

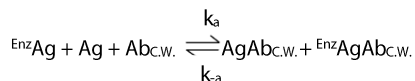
3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз (ТИП 5):

Основні реагенти, необхідні для твердофазного імуноферментного аналізу, включають іммобілізоване антитіло, кон'югат фермент-антиген та нативний антиген.

При змішуванні іммобілізованого антитіла, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, виникає реакція конкуренції між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість нерозчинених сайтів зв'язування.

Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{\text{c.w.}}$ = Моноспецифічне іммобілізоване антитіло (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

EnzAg = Кон'югат Фермент-антиген (постійна кількість)

$\text{AgAb}_{\text{c.w.}}$ = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{c.w.}}$ = Комплекс Кон'югат Фермент-антиген – Антитіло

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

$K = k_a/k_{-a}$ = Постійна рівноваги

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відокремлюється від незв'язаного антигену декантацією або аспірацією. Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, обернено пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи кілька різних еталонів сироватки відомих концентрацій антигену, можна сформулювати криву реакції на дозу, з якої можна встановити концентрацію антигену невідомого.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Т3 – 1 мл/флакон

Шість (6) флаконів референсної сироватки для трийодтироніну в концентраціях 0 (A), 0.5 (B), 1.0 (C), 2.5 (D), 5.0 (E) та 7.5 (F) у нг/мл. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

Для одиниць SI: нг/мл x 1.536 = нмоль/л

B. Ферментний реагент Швидкого Т3 – 1.5 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить кон'югат Т3-пероксидаза хрому (HRP) у стабілізуючій матриці альбуміну. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

C. Буфер кон'югату Т3/Т4 - 13 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить буфер, барвник, консервант та інгібітори зв'язуючого білка. Зберігати при температурі 2-8 °C.

D. Пластина, покрита антитілами до Т3 - 96 лунок

Один мікропланшет із 96 лунками, покритий овечою анти-Т3 сироваткою, упакований в алюмінієвий пакет із сушільним агентом. Зберігати при температурі 2-8 °C.

E. Концентрат промивного розчину - 20 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить сурфактант у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

F. Субстрат - 12 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМВ) та пероксид водню (H₂O₂) у буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C.

G. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (0.5M H₂SO₄). Зберігати при температурі 2-8 °C.

H. Інструкція.

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності набору.

Примітка 2: Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C. Стабільність набору та компонента вказана на етикетці.

Примітка 3: Вищевказані компоненти призначені для одного 96-лунокового мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Піпетка здатна подавати обсяги 0.50 мл (50 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Дозатор (и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (100 мкл) та 0.350 мл (350 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Дозатор (-и) регульованого об'єму (20-200 мкл) та (200-1000 мкл) для приготування кон'югату та субстрату.
4. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
6. Пробірки для приготування ферментного кон'югату і субстрату А плюс В.
7. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
8. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
9. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
10. Таймер.
11. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Набір призначений тільки для діагностики in vitro

Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах

Всі продукти, що містять сироватку, протестовані методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2nd Edition, 1988, HHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразки повинні представляти собою сироватку або плазму за типом та отримані із звичайними запобіжними заходами при відборі зразків венепункцією. Для точного порівняння для встановлення нормальних значень слід отримати зразки сироватки вранці натще. Кров слід збирати у пробірки з червоним ковпачком для проколювання вен без добавок або антикоагулянтів (для сироватки) або вакуумні пробірки, що містять ЕДТА чи гепарин. Дайте крові згуститися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C протягом максимум п'яти (5) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °C до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Для аналізу у двох примірниках потрібно 0.100 мл (100 мкл) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні гіпотиреоїдного, еутиреоїдного та гіпертиреоїдного діапазону для моніторингу результатів аналізу. Ці контроли повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Робочий реагент А = Розчин кон'югату Т3-фермент

Розведіть ферментний реагент Швидкого Т3 1:11 буфером кон'югату Загальний Т3/Т4 у відповідному контейнері. Наприклад, розведіть 160 мкл реагенту з 1.6 мл буфера для 16 лунок. (Утворюється невеликий надлишок розчину.) Цей робочий реагент слід використовувати протягом двадцяти чотирьох годин для максимальної ефективності аналізу. Зберігати при температурі 2-8 °С.

Загальна формула:

Кількість необхідного буфера = Кількість лунок * 0.1

Необхідна кількість ферменту Швидкого Т3 = кількість лунок * 0.01

тобто = 16 x 0.1 = 1.6 мл для буфера Загального Т3/Т4

16 x 0.01 = 0.16 мл (160 мкл) для ферменту Швидкого Т3

2. Промивний буфер

Розведіть вміст концентрату для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою у відповідній ємності для зберігання. Зберігати розведений буфер при температурі 2-30 °С до 60 днів.

Примітка 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він має синє забарвлення.

Примітка 2: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактеріальний ріст.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референсні калібратори і контроли повинні досягти кімнатної температури (20-27 °С).

****Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем****

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °С.
- Внесіть 0.050 мл (50 мкл) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю або зразка у призначену лунку.
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) Робочого реагенту А (ферментного реагенту Т3) в кожну лунку (див. Розділ підготовки реагентів).
- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд для перемішування та накрийте його.
- Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) розчину субстрату у всі лунки (див. Розділ «Підготовка реагенту»). Завжди додайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОБАВЛЕННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом п'ятнадцяти (15) хвилин.
- Додайте 0.050 мл (50 мкл) стоп-розчину в кожну лунку та обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Для повторного випробування зразків з концентрацією більше 7.5 нг/мл піпетуйте 25 мкл зразка та 25 мкл контрольного калібратора «0» сироватки у лунку для зразка (це підтримує рівномірну концентрацію білка). Помножьте значення зчитування на 2, щоб отримати концентрацію трийодтироніну.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Т3 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного калібратора в дублях відповідно до концентрації Т3 в нг/мл на лінійному міліметровому папері (перед тим, як скласти графік, не слід усереднювати дублікати референсного матеріалу сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію Т3 для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у нг/мл) з горизонтальної вісі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (1.130) перетинає криву реакції на дозу при концентрації Т3 1.95 нг/мл (див. Малюнок 1).

Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ELISA, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

I.D. зразка	Номер лунки	Abs (A)	Середнє Abs (B)	Значення (нг/мл)
Калібратор А	A1	2.604	2.556	0
	B1	2.507		
Калібратор В	C1	2.073	2.101	0.5
	D1	2.128		
Калібратор С	E1	1.678	1.662	1.0
	F1	1.646		
Калібратор D	G1	0.964	0.966	2.5
	H1	0.969		
Калібратор E	A2	0.550	0.551	5.0
	B2	0.551		
Калібратор F	C2	0.372	0.370	7.5
	D2	0.369		
Контроль 1	E2	1.701	1.726	0.92
	F2	1.638		
Контроль 2	G2	0.755	0.734	3.58
	H2	0.791		
Пацієнт 1	A3	1.145	1.130	1.95
	B3	1.115		

Малюнок 1

(Див. в оригіналі інструкції).

*Дані, наведені в прикладі 1 та на малюнку 1, служать лише для ілюстрації і **не повинні** використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Абсорбція (OD) калібратора 0 нг/мл повинна бути ≥ 1.3 .
- Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналізу ризиків для цього продукту доступна за запитом від Monobind Inc.

12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.

4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Зразки пацієнтів з концентрацією ТЗ більше 7.5 нг/мл можуть бути розведені 1/2 «0» референсним калібратором сироватки. Концентрацію зразка отримують множенням результату на коефіцієнт розведення, 2.
10. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
11. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
12. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
13. Аналіз ризиків - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур тестової системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів (Boscatto LM, Stuart MC. "Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays" Clin.Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
4. Для дійсних результатів випробувань адекватні засоби контролю та інші параметри повинні відповідати переліченим діапазонам та вимогам до аналізу.
5. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Загальна концентрація трийодтироніну в сироватці залежить від безлічі факторів: функції щитовидної залози та її регуляції, концентрації трийодтироніну, що зв'язує глобулін (ТБГ), та зв'язування трийодтироніну з ТБГ.^{3,4} **Отже, концентрації загального трийодтироніну недостатньо для оцінки клінічного стану.**
8. Зниження значень загального трийодтироніну виявляється при захворюваннях з втрапою білка, деяких захворюваннях печінки та при застосуванні тестостерону, дифенілгдантоїну або саліцилатів. Таблиця інтерферуючих лікарських засобів та станів, які впливають на загальний вміст трийодтироніну, складена в Журналі Американської асоціації клінічних хіміків.

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Було проведено дослідження еутиреоїдної дорослої популяції для визначення очікуваних значень для тест-системи ELISA Rapid T3 AccuBind®. Середні значення (R), стандартні відхилення (σ) та очікувані діапазони (± 2σ) представлені в таблиці 1. Загальна кількість зразків становила 105.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для тестової системи ELISA T3 (в нг/мл)	
Середнє (X)	1.184
Стандартне відхилення (σ)	0.334
Очікувані діапазони (± 2σ)	0.52-1.85

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності "нормальних" людей, залежить від безлічі факторів: специфіки методу, сукупності тестованих та точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити власний діапазон значень, використовуючи метод з корінним населенням до району, в якому розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність вимірювання тестової системи Rapid T3 AccuBind® ELISA в аналізі та між аналізами була визначена за допомогою аналізів на трьох різних рівнях контрольних пулованих сироваток. Кількість, середні значення, середнє відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в таблицях 2 та 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (значення в нг/мл)				
Зразок	N	X	σ	CV%
Низький	20	0.92	0.04	4.0
Нормальний	20	2.06	0.07	3.2
Високий	20	3.11	0.06	2.1

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами (значення в нг/мл)				
Зразок	N	X	σ	CV%
Низький	20	0.96	0.07	7.1
Нормальний	20	2.14	0.13	59.9
Високий	20	3.23	0.23	7.1

*Виміряно в десяти експериментах у двох примірниках протягом десяти днів.

14.2 Чутливість

Тестова система Rapid T3 AccuBind® ELISA має чутливість 0.068 нг/мл. Чутливість визначали, визначаючи мінімальність калібратора сироватки 0 нг/мл та використовуючи статистику 2σ (95% достовірність) для розрахунку мінімальної дози.

14.3 Достовірність

Тест-систему Rapid T3 AccuBind® ELISA порівнювали з референсним методом радіоімунологічного аналізу. Були використані біологічні зразки з гіпотиреоїдної, еутиреоїдної та гіпертиреоїдної популяцій. (Значення коливались від 0.15 нг/мл до 8.0 нг/мл). Загальна кількість таких зразків становила 120. Рівняння найменшої квадратної регресії та коефіцієнт кореляції були розраховані для тест-системи Rapid T3 AccuBind® ELISA порівняно з референсним методом. Отримані дані відображаються в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Аналіз найменшої квадратної регресії	Коефіцієнт кореляції
Метод Monobind	1.62		
Референсний	1.68	$y = 3.8 + 0.947(x)$	0.987

Лише незначні значення зміщення між цим методом та референсним методом вказуються на близькість середніх значень. Рівняння найменшої квадратичної регресії та коефіцієнт кореляції вказує на чудову узгодженість методу.

14.4 Специфічність

Перехресну реакційну здатність антитіла трийодтироніну до вибраних речовин оцінювали шляхом додавання інтерферуючої речовини до матриці сироватки при різних концентраціях. Перехресну реакційну здатність розраховували, отримуючи співвідношення між дозою інтерферуючої речовини та дозою трийодтироніну, необхідною для витіснення тієї ж кількості кон'югату.

Субстанція	Перехресна реактивність	Концентрація
I-Трийодтиронін	1.0000	-
I-Тироксин	< 0.0002	10 мкг/мл
Йодотирозин	< 0.0001	10 мкг/мл
Дийодтирозин	< 0.0001	10 мкг/мл
Дийодтиронін	< 0.0001	10 мкг/мл
Фенілбутазон	< 0.0001	10 мкг/мл
Саліцилат натрію	< 0.0001	10 мкг/мл



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

