

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНОГО ТРИЙОДТИРОНІНУ (fT3)

1325-300, Free Triiodothyronine (fT3) Test System

Каталог. №: 1325-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 06-07-2012

Версія 3



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

ПРИЗНАЧЕННЯ

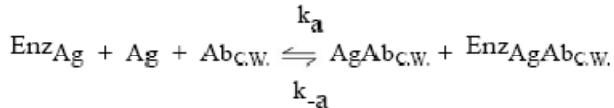
Кількісне визначення концентрації вільного Трийодтироніну (fT3) в людській сироватці. Вважається, що рівні fT3 відображають кількість T3, доступного клітинам, і можуть, таким чином, визначати клінічний метаболічний статус T3.

ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз (тип 5)

Реагенти, що вимагаються для твердофазового імуноферментного аналізу, включають іммобілізовані антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген. У процесі аналізу при взаємодії осередків, покритих антитілами, кон'югату фермент-антиген і нативного антигену, що містяться в сироватці, відбувається конкуренція між антигеном зразка і кон'югатом фермент-антиген за обмежене число іммобілізованих сторін зв'язування. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{\text{C.W.}}$ = Моноспецифічні іммобілізовані антитіла (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 - антитіла

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

$K = k_a / k_{-a}$ = константа рівноваги

Після досягнення рівноваги пов'язана з іммобілізованими антитілами фракція відділяється від незв'язаних антигенів декантацією або аспірацією. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Референсна людська сироватка - 1 мл у флаконі

Шість флаконів референсної сироватки (Калібраторів) з концентраціями fT3 приблизно* 0 (A), 1.0 (B), 3.0 (C), 5.0 (D), 8.0 (E) і 16.0 (F) пг/мл. Зберігати при 2-8 °С. Містять консервант. Для переведення одиниць: 1 пг/мл x 1.536 = пмоль/л

*Точні концентрації, що залежать від лота, наведені на етикетках флаконів.

B. fT3-Ферментний реагент - 13 мл у флаконі

Один флакон, що містить кон'югат Трийодтироніну з пероксидазою хрому в розчині бичачого альбуміну - стабілізуючій матриці. Містять консервант. Зберігати при 2-8 °С.

C. Планшет, покритий антитілами до T3, 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий анти-T3 сироваткою вівці і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

D. Концентрат розчину для промивання - 20 мл

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містять консервант. Зберігати при 2-30 °С.

E. Субстрат А - 7 мл у флаконі

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

F. Субстрат В - 7 мл у флаконі

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

G. Стоп-розчин - 8.0 мл у флаконі

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-30 °С.

H. Інструкція

Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Мікродозатори на 50 і 100 мкл з точністю вищою 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гіршою 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер.
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Посудини для приготування Робочого субстратного розчину і промивального буфера.
6. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
7. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
8. Таймер
9. Контрольні матеріали.

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С.

ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Потенційно небезпечний біоматеріал. Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована 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 Publication No. (CDC) 88-8395.

ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Повинні дотримуватися звичайних застережних заходів. Для належного порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8°C до 48 годин. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °С на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях потрібно 0.100 мл сироватки.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контрольні з рівнями гіпо-, гіпер- і еутіреїдного діапазонів для відстеження характеристик набору. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що постачаються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або розкладанні реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Розчин для промивання

Вилийте вміст концентрату розчину для промивання в посудину об'ємом 1000 мл. Розбавте до 1000 мл дистильованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (20-27 °С) до 60 днів.

2. Робочий субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст коричневого флакона з субстратом А у флакон з Субстратом В. Закрийте суміш жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть флакон «Робочий розчин субстрату». Розчин зберігається при 2-8 °С.

Зауваження 1: не використовуйте робочий розчин субстрату, якщо він придбає блакитне забарвлення.

Зауваження 2: не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °С).

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °С.**
2. Додайте піпеткою по 50 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків в відповідні лунки.
3. Додайте піпеткою по 100 мкл розчину fT3 ферментного реагенту в кожну лунку.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
5. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальної папері, якщо використовувалася декантація.
7. 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 бутылка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
8. Додайте піпеткою по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. "Приготування реагентів"). **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути розбіжностей в часі реакції в різних лунках.**

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

9. Інкубуйте 15 хв. при кімнатній температурі.
10. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну клітинку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте осередку протягом 15-20 секунд. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**
11. Виміряйте величини поглинання вмісту осередків на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводите при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Т3 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації fT3 в пг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте невідомі концентрації fT3 в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція (1.855) перетинає стандартну криву при 2.1 пг/мл (див. мал.1).

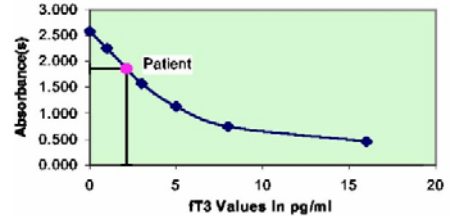
Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Значення (пг/мл)
Калібратор А	A1	2.658	2.579	0.0
	B1	2.531		
Калібратор В	C1	2.264	2.248	1.0
	D1	2.233		
Калібратор С	E1	1.570	1.578	3.0
	F1	1.585		
Калібратор D	G1	1.124	1.135	5.0
	H1	1.145		

Калібратор Е	A2	0.749	0.748	8.0
	B2	0.748		
Калібратор F	C2	0.463	0.463	16.0
	D2	0.462		
Пацієнт 1	E2	1.860	1.855	2.1
	F2	1.849		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

1. Оптична щільність калібратора А ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

А. Якість набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. 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 мікролунки.
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. 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.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. 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.
12. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

В. Інтерпретація результатів

1. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
2. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
3. **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.
4. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
5. Якщо значення зразка пацієнта вище, ніж значення вищого калібратора (тобто > 16 пг/мл) **Не намагайтеся розводити зразки сироватки. Варіації ТСГ в різних матрицях не дозволяють проводити серійне розведення fT3.**
6. Відомо, що різні ліки впливають на зв'язування Т3 з білками-переносниками тиреоїдних гормонів або на метаболізм Т3 і ускладнюють інтерпретацію результатів визначення fT3 (3).
7. Циркулюючі аутоантитіла до Т3 та інгібітори зв'язування гормонів також можуть впливати на результати аналізу.

- Було показано, що гепарин впливає на концентрацію fT3 *in vivo* і *in vitro* (5). Отже, не використовуйте зразки, де використовувався цей антикоагулянт.
- При важких нетиреоїдних захворюваннях оцінка тиреоїдного статусу ускладнена. Рекомендується вимір ТТГ для оцінки тиреоїдної дисфункції (6).
- У рідкісних випадках, таких, як сімейна дісальбумінемія, пряме визначення fT3 може призводити до помилкових висновків.

НАБІР НЕ ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ СКРИНІНГУ НОВОНАРОДЖЕНИХ

ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Було проведено дослідження дорослої еутиреоїдної популяції цим набором і отримані наступні результати:

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для Т3 в пг/мл

	Дорослі (110 зразків)	Вагітні (75 зразків)
Середнє (X)	2.8	3.0
Стандартне відхилення (δ)	0.7	0.6
Очікувані діапазони (± 2δ)	1.4 - 4.2	1.8 - 4.2

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

А. Точність

Точність набору fT3 всередині серії і між серіями визначалася в аналізі півів сироваток трьох різних рівнів. Число (n), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (пг/мл)

Взорець	N	x	δ	C.V., %
Низький	24	1.85	0.09	4.9
Середній	24	4.49	0.16	3.6
Високий	24	8.00	0.25	3.1

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами (пг/мл)

Взорець	N	x	δ	C.V., %
Низький	12	2.16	0.29	13.1
Середній	12	5.09	0.40	7.9
Високий	12	9.13	0.94	10.2

* Всі вимірювання проводилися в 12 постановках, в дублях.

В. Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним радіоімунним методом. Використовувалися зразки гіпотиреоїдних, еутиреоїдних і гіпертиреоїдних пацієнтів (діапазон значень від 0.1 до 14 пг/мл). Загальне число зразків було 151. Було виведено рівняння регресії і розрахований коефіцієнт кореляції для fT3 ІФА у порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Monobind EIA "X"	3.05	$y = 0.35 + 0.922(x)$	0.902
Predicate RIA "Y"	2.92		

Була визначена тільки незначна розбіжність даного методу та референс-методу, що доводить близькість середніх значень. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

С. Чутливість

Метод має чутливість 0.05 пг/мл. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (пг/мл) плюс 2σ (стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

D. Специфічність

Вплив перехресних речовин оцінювався при додаванні значної кількості речовин в різних концентраціях до сироватки. Крос-реактивність розраховували як співвідношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою трийодтироніну, необхідною для реакції з однаковою кількістю трейсера.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
I-Трийодтиронин	1.0000	-
I-Тироксин	< 0.0002	10 мкг/мл
Йодотирозин	< 0.0001	10 мкг/мл
Диодотирозин	< 0.0001	10 мкг/мл
Диодотиронин	< 0.0001	10 мкг/мл
Фенилбутазон	< 0.0001	10 мкг/мл
Салицилат натрія	< 0.0001	10 мкг/мл



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

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