

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТРИЙОДТИРОНІНУ ЗАГАЛЬНОГО МЕТОДОМ ІФА

Total Triiodothyronine (tT3) Test System

Кат. №: 125-300A

Дата випуску інструкції: 01-05-2022

Версія: 4



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

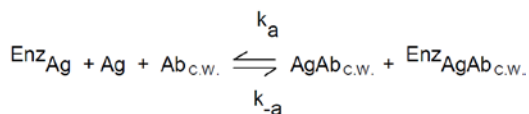
Призначення: Кількісне визначення концентрації Трийодтироніну загального в калібраторах Т3 або плазмі за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз (ТИП 5)

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



$\text{Ab}_{\text{c.w.}}$ = Моноспецифічні іммобілізовані антитіла (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

Enz_{Ag} = Кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

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

$\text{Enz}_{\text{Ag}}\text{Ab}_{\text{c.w.}}$ = 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'язаного антигену 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.

4.0 РЕАГЕНТИ

A. Референсні матеріали калібраторів Трийодтироніну - 1 мл (мл)/флакон

Шість флаконів референсної сироватки для Трийодтироніну з концентраціями 0 (A), 0.5 (B), 1.0 (C), 2.5 (D), 5.0 (E) і 7.5 (F) нг/мл (ng/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.

Для SI одиниць: нг/мл (ng/ml) x 1.536 = нмоль/л (nmol/l)

B. Ферментний реагент Трийодтироніну - 1.5 мл (мл)/флакон

Один флакон кон'югату Трийодтиронін-пероксидаза хрому (HRP) в альбумін-стабілізуючій матриці. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

C. Буфер кон'югату Трийодтиронін/Тиросин - 13 мл (мл)

Одна пляшка, що містить буфер, червоний барвник, консервант і білок-зв'язуючий інгібітор. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий антитілом Т3 - 96 лунок

Один 96-луноквий мікропланшет, покритий сироваткою антитіл вівці до Трийодтироніну і запакований у фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

G. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

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

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

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

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказані на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного 96-луноквого планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатори на 50 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 0.100 і 0.350 мл (ml) з точністю не гірше 1.5%.
3. Диспенсери змінного об'єму (20-200 мкл (μl) і (200-1000 мкл (μl)) для приготування розчинів субстрату і кон'югату.
4. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
6. Тестові пробірки для приготування Ферментного кон'югату та субстратів А та В.
7. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
8. Поліетиленова плівка або кришка 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**

Усі продукти, що містять людську сироватку, були визнані нереактивними щодо поверхневого антигену гепатиту В, ВІЛ 1 і 2 та антитіл до ВГС згідно з вимогами FDA. Оскільки жоден відомий тест не може забезпечити повну певненість у відсутності інфекційних агентів, усі продукти калібраторів Трийодтироніну слід розглядати як потенційно небезпечні та здатні передавати захворювання. Належну лабораторну практику поводження з продуктами крові можна знайти в Центрі контролю захворювань/Національному інституті здоров'я, «Біологічна безпека в мікробіологічних і біомедичних лабораторіях», 2-е видання, 1988 р., публікація HHS № (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору має здійснюватися відповідно до місцевих нормативних та законодавчих вимог.

6.0 ЗБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразками служить кров; сироватка або плазма за типом, а також слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів під час збору зразків венепункцією. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірки з червоним ковпачком без добавок або антикоагулянтів (для сироватки) або вакуумні пробірки, що містять ЕДТА або гепарин. Дайте крові згорнутися для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.100 мл (ml) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати зовнішні контролю на рівнях гіпотиреоїдного, еутиреоїдного та гіпертиреоїдного діапазонів для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролю слід розглядати як невідомі, а значення визначати в кожній проведеній процедурі тестування. Для відстеження ефективності наданих реагентів слід підтримувати карти контролю якості. Для встановлення тенденцій слід використовувати відповідні статистичні методи. Окрема лабораторія повинна встановити свої допустимі межі ефективності аналізу. Крім того, максимальна абсорбція повинна відповідати минулому досвіду. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про непомічену зміну умов тесту або погіршення якості реагентів набору. Щоб визначити причину відхилення, слід використовувати свіжі реагенти.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Робочий реагент А - Розчин кон'югату Трийодтиронін-фермент

Розбавте кон'югат Трийодтиронін-фермент 1:11 буфером кон'югату Трийодтиронін/Тироксин в підходящій ємності. Наприклад, змішайте 160 мкл (μ l) кон'югату з 1.6 мл (ml) буфера для 16 лунок (вийде невеликий надлишок розчину). Цей розчин повинен бути використаний протягом 24 годин для максимальної ефективності аналізу. Зберігайте при 2-8 °C (°C).

Загальна формула:

Необхідна кількість буфера = кількість лунок x 0.1

Необхідна кількість кон'югату Трийодтиронін-фермент = n лунок x 0.01, наприклад, = 16 x 0.1 = 1.6 мл (ml) для буфера кон'югату Загальний Трийодтиронін/Тироксин

16 x 0.01 = 0.16 мл (ml) (160 мкл (μ l)) для ферментного кон'югату Трийодтироніну

2. Промивний Буфер

Розбавте концентрату розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

3. Розчин Робочого Субстрату

Перелийте вміст бурштинового флакона, позначеного як Розчин «А», у прозорий флакон, позначений як Розчин «В». Закрийте жовтою кришкою прозорий флакон для легкої ідентифікації. Змішайте та позначте відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C (°C).

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

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

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референси і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

****Процедуру тестування має виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

- Відформатуйте лунки мікропланшету для кожного сироваткового референсу, контролю та зразка пацієнта, які потрібно аналізувати у двох примірниках. Поверніть будь-які невикористані мікролункові стрипи назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 0.050 мл (ml) (50 мкл (μ l)) відповідного сироваткового референсу, контролю та зразка пацієнта у визначені лунки.
- Додайте по 0.100 мл (ml) (100 мкл (μ l)) Робочого реагенту А, реагенту Ферменту Трийодтироніну у кожен лунку (див. розділ «Підготовка реагентів»).
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл (μ l) промивного буфера (див. розділ «Підготовка реагентів»), декантуйте або аспіруйте. 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 пляшка під тиском, наповнити кожен лунку до верху (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 0.100 мл (ml) (100 мкл (μ l)) розчину Робочого субстрату в кожен лунку (див. «Підготовка реагентів»). Завжди додавайте реагенти в

одні і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 0.050 мл (ml) (50 мкл (μ l)) стоп-розчину і перемішайте 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.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Зауваження: Для повторного аналізу зразків з концентрацією більшою, ніж 7.5 нг/мл (ng/ml), додайте 25 мкл (μ l) зразка та 25 мкл (μ l) нульової (0) референсної сироватки в лунки підтримки постійної концентрації білка). Отриманий результат слід помножити на 2, щоб отримати концентрацію Трийодтироніну.

10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Трийодтироніну в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

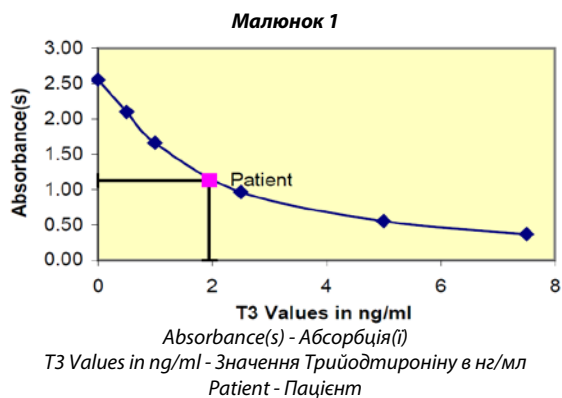
- Запишіть абсорбцію, отриману з роздруківки пристрою для зчитування мікропланшетів, як описано в прикладі 1.
- Відкладіть на лінійному міліметровому папері оптичну абсорбцію для кожного дублікату референсної сироватки проти відповідної концентрації Трийодтироніну в нг/мл (ng/ml) (не усереднюйте дублікати референсної сироватки перед побудовою графіка).
- Побудуйте оптимальну калібрувальну криву.
- Щоб визначити концентрацію Трийодтироніну для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублів для кожного невідомого на вертикальній осі (вісь y) графіка, знайдіть точку перетину на кривій і прочитайте концентрацію (y нг/мл (ng/ml)) на горизонтальній осі (вісь X) графіка (дублікати невідомого можна усереднити, як зазначено). У наступному прикладі середнє поглинання (1.130) перетинає криву дози-відповіді при концентрації Трийодтироніну 1.95 нг/мл (ng/ml) (див. Рис. 1).

Примітка: Для аналізу даних можна використовувати комп'ютерне програмне забезпечення для обробки даних, розроблене для аналізів ІФА. Якщо використовується таке програмне забезпечення, слід перевірити перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (нг/мл (ng/ml))
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	0.954	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	A3	1.145	1.130	1.95
	B3	1.115		

*Дані наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора 0 нг/мл (ng/ml) має бути ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНЛІЗ РИЗИКІВ

12.1. Якість роботи 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 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 концентраціями Трийодтироніну вищими 7.5 нг/мл (ng/ml) розводять 0 контрольною сироваткою 1:2 в лунці для зразка. Отриманий результат слід помножити на 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 - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЕС, з маркуванням CE IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених компанією Monobind, можна замовити електронною поштою на адресу Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретацію результатів має виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
4. 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.
5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

6. Загальна концентрація трийодтироніну в сироватці крові залежить від багатьох факторів: функції щитовидної залози та її регуляції, концентрації тироксиназв'язуючого глобуліну (ТЗГ) і зв'язування Трийодтироніну з ТЗГ. **Таким чином, лише визначення концентрації Трийодтироніну загального недостатньо для оцінки клінічного статусу.**

7. Зниження рівня загального Трийодтироніну спостерігається при захворюваннях, пов'язаних з дефіцитом білка, деяких захворюваннях печінки та прийомі тестостерону, дифенілгідантоїну або саліцилатів. Журнал Американської асоціації клінічних хіміків склав таблицю лікарських засобів і станів, що впливають на загальний трийодтиронін.

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Для визначення очікуваних значень для Тест-системи Трийодтиронін AccuBind™ ІФА було проведено дослідження еутиреоїдного дорослого населення. Середні (R) значення стандартних відхилень (σ) та очікувані діапазони ($\pm 2 \sigma$) представлені в таблиці 1. Загальна кількість зразків становила 105.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для Тест-системи Трийодтиронін AccuBind™ ІФА (в нг/мл (ng/ml))

Середнє (X)	1.184
Стандартне відхилення (δ)	0.334
Очікуваний діапазон ($\pm 2 \delta$)	0.52 - 1.85

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які, як очікується, буде знайдено даним методом для популяції «нормальних» людей, залежить від безлічі факторів: специфіки методу, перевіреної популяції і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, лише до тих пір, поки внутрішній діапазон не буде визначений аналітиками за допомогою методу з корінним населенням території, в якій розташована лабораторія.

14.0 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Точність

Точність Тест-системи Трийодтиронін AccuBind™ ІФА в аналізі та між аналізами визначали за допомогою аналізу трьох різних рівнів пулу контрольних сироваток. Кількість (N), середнє значення (X), стандартне відхилення (σ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для кожної з цих контрольних сироваток представлені в таблиці 2 і таблиці 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	16	0.78	0.06	7.9
Нормальний	16	1.92	0.10	5.4
Високий	16	3.55	0.14	3.9

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	10	0.76	0.07	8.9
Нормальний	10	1.85	0.13	6.7
Високий	10	3.43	0.16	4.5

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях протягом 10 днів.

14.2 Чутливість

Тест-система Трийодтиронін AccuBind™ ІФА має чутливість 0.04 нг/мл (ng/ml). Чутливість була встановлена шляхом визначення варіабельності сироваткового калібратора 0 нг/мл (ng/ml) і використання статистики 2 σ (95% вірогідності) для розрахунку мінімальної дози.

14.3 Достовірність

Тест-систему Трийодтиронін AccuBind™ ІФА порівнювали з референсним методом радіоімунного аналізу. Були використані біологічні зразки з гіпотиреоїдних, еутиреоїдних і гіпертиреоїдних популяцій (значення коливаються від 0.15 нг/мл (ng/ml) до 8.0 нг/мл (ng/ml)). Загальна кількість таких зразків становила 120. Рівняння регресії найменших квадратів ($y=mx+b$) і коефіцієнт кореляції були розраховані для Тест-системи Трийодтиронін AccuBind™ ІФА у порівнянні з референсним методом. Отримані дані відображені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння лінійної регресії	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	1.62	$y = 3.8 + 0.947 (x)$	0.987
Референсний	1.68		

Було знайдено тільки незначну розбіжність даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресну реактивність антитіл до трийодтироніну з вибраними речовинами оцінювали шляхом додавання інтерферуючої речовини до матриці сироватки в різних концентраціях. Перехресну реактивність розраховували шляхом отримання співвідношення між дозою інтерферуючої речовини та дозою Трийодтироніну, необхідною для витіснення такої ж кількості кон'югату.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
I-Трийодтиронін	1.0000	-
I-Тироксин	< 0.002	10 мкг/мл (µg/ml)
Йодотирозин	< 0.001	10 мкг/мл (µg/ml)
Дийодотирозин	< 0.001	10 мкг/мл (µg/ml)
Дийодотиронін	< 0.001	10 мкг/мл (µg/ml)
Фенілбутазон	< 0.001	10 мкг/мл (µg/ml)
Саліцилати натрію	< 0.001	10 мкг/мл (µg/ml)



ВИРОБНИК

<i>MONOBIND INC.</i>	<i>МОНОБАЙНД ІНК</i>
<i>100 North Pointe Dr.</i>	<i>100 Норд Поінт Драйв</i>
<i>Lake Forest, CA 92630 - USA</i>	<i>Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США</i>
<i>Phone: 949.951.2665</i>	<i>Тел.: 949.951.2665</i>
<i>Fax: 949.951.3539</i>	<i>Факс: 949.951.3539</i>
www.monobind.com	www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

