

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНОГО ТРИЙОДТИРОНІНУ (fT3)

1325-300A, Free Triiodothyronine (fT3) Test System

Каталог. №: 1325-300A

Дата випуску інструкції: 11-05-2020

Кількість : 96

Версія 4

Виробник : Monobind Inc., (США)



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

1.0 ПРИЗНАЧЕННЯ

Застосування за призначенням: Кількісне визначення концентрації вільного трийодтироніну в сироватці крові за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу. Вважається, що рівні fT3 відображають кількість T3, доступного клітинам, і, отже, може визначати клінічний метаболічний статус T3.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

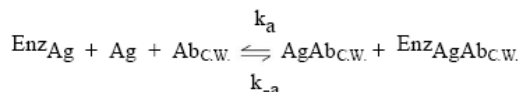
3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз ТИП 5

(Аналоговий метод для вільного T3)

Основні реагенти, необхідні для твердофазного імуноферментного аналізу, включають іммобілізоване антитіло T3, кон'югат фермент-T3 та нативний антиген вільного T3. Кон'югат фермент-T3 не повинен мати вимірюваного зв'язування з білками сироватки, особливо з TBG та альбуміном. Метод досягає цієї мети.

При змішуванні іммобілізованого антитіла, кон'югату фермент-T3 та сироватки, що містить нативний антиген вільного T3, виникає реакція конкуренції між нативним вільним T3 та кон'югатом фермент-T3 для обмеженої кількості нерозчинених сайтів 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

$\text{EnzAg Ab}_{\text{C.W.}}$ = 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'язаних антигенів декантацією або аспірацією. Активність ферменту у фракції пов'язаних антигенів 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

Матеріали, що постачаються:

A. Референсна людська сироватка – 1 мл/флакон

Шість флаконів референсної сироватки для вільного трийодтироніну 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 °C. Містять консервант. Для переведення одиниць: 1 пг/мл x 1.536 = пмоль/л

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

B. Ферментний реагент fT3 – 13 мл/флакон

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

C. Планшет, покритий антитілом T3 – 96 лунок

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

D. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

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

E. Субстрат А – 7 мл/флакон

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

F. Субстрат В – 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

G. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

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

H. Інструкція

Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Піпетка, здатна подавати об'єм 50 мкл з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Дозатор (и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл та 0.350 мл з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Вошер для мікропланшетів або гнучка пляшка (опційно).
4. Зчитувач мікропланшетів з довжини хвилі поглинання 450 нм і 620 нм.
5. Абсорбуючий папір для промокання лунок мікропланшетів.
6. Пластикові упаковки або кришка мікропланшета для етапів інкубації.
7. Вакуумний аспіратор (опційно) для етапів промивання.
8. Таймер.
9. Матеріали для контролю якості.

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

Примітка 2: Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C. Стабільність набору та компонентів вказана на етикетці.

Примітка 3: Вищезазначені реагенти призначені для одного 96-луночкового мікропланшета.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

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.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 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 протягом максимум п'яти (5) днів. Якщо зразок (и) не вдається проаналізувати протягом цього часу, зразок (зразки) можуть зберігатися при температурі -20 °C до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування. Для аналізу в двох примірниках потрібно 0.050 мл зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні гіпотиреоїдного, еутиреоїдного та гіпертиреоїдного діапазону для моніторингу результатів аналізу. Ці контролі слід розглядати як невідомі та значення повинні визначатись в кожній проведеній процедурі тестування. Слід вести таблиці контролю якості, щоб стежити за показниками реагентів, що постачаються. Для встановлення тенденцій слід застосовувати відповідні статистичні методи. Індивідуальна лабораторія повинна встановити допустимі межі ефективності аналізу. Крім того, максимальна абсорбція повинна відповідати минулому досвіду. Значне відхилення від встановлених показників може свідчити про непомітну зміну експериментальних умов або погіршення стану реагентів.

Свіжі реактиви слід використовувати для визначення причини змін.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Розчин для промивання

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

2. Робочий розчин субстрату

Влийте вміст бурштинового флакона з розчином «А» у прозорий флакон із розчином «В». Покладіть жовту кришку на прозорий флакон для зручності ідентифікації. Змішайте і позначте відповідно. Зберігайте при температурі 2-8 °C.

Зауваження 1: Не використовуйте робочий розчин субстрату, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовуйте забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

****Процедуру випробування повинен проводити кваліфікований фахівець або підготовлений фахівець****

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного матеріалу, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки мікролунок назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C.
- Додайте піпеткою по 50 мкл сироваткового референсного матеріалу, контролю та зразка пацієнта в відповідні лунки.
- Додайте піпеткою по 100 мкл розчину fT3-ферментного реагенту в кожен лунку.
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальній папері, якщо використовувалася декантація.
- 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 кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте піпеткою по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен 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

- Інкубуйте 15 хв. при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен 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.**
- 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.**

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації fT3 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації fT3 в пг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- 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 fT3 (див. мал.1).

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

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	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 E	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 та Рисунок 1, служать лише для ілюстрації і не повинні використовуватися замість стандартної кривої, підготовленої для кожного аналізу. Призначені значення для калібраторів специфічні для партії.

Малюнок 1

(Малюнок див. в оригіналі інструкції)

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Для того, щоб результати аналізу вважалися дійсними, вони повинні відповідати наступним критеріям:

- Оптична щільність (OD) калібратора A \geq 1.3.
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

Бланк безпеки та аналіз ризику для цього продукту можна отримати на замовлення від Monobind Inc.

12.1 Ефективність аналізу

- 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.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- 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.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.

- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реактиви з різних партій.
- 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.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- 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.
- Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви CE 98/79/EC з маркуванням IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні виконуватися кваліфікованою особою або навченим фахівцем.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- 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.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Якщо значення зразка пацієнта вище, ніж значення вищого калібратора (тобто > 16 пг/мл) **Не намагайтеся розводити зразки. Варіації TBG в різних матрицях не дозволяють проводити серійне розведення fT3.**
- Відомо, що різні ліки впливають на зв'язування T3 з білками-переносниками тиреоїдних гормонів або на метаболізм T3 і ускладнюють інтерпретацію результатів визначення fT3.
- Циркуючі аутоантитіла до T3 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 дисальбумінемія, пряме визначення fT3 може призводити до помилкових висновків.

«НАБІР НЕ ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ СКРИНІНГУ НОВОНАРОДЖЕНИХ»

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Було проведено дослідження дорослої еутиреоїдної популяції для визначення очікуваних значень для тест-системи fT3 AccuBind™ ELISA. Середні значення (X), стандартні відхилення (σ) та очікувані діапазони (± 2σ) представлені в таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1
Очікувані значення для Вільного T3 в пг/мл

	Дорослі	Вагітні
Кількість зразків	110	75
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 встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності "нормальних" осіб, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, сукупності перевіреної популяції і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановленого виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити власний діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому розташована лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору fT3 всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів 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)

Зразок	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)

Зразок	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.

14.2 Чутливість

Метод має чутливість 0.410 пг/мл. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (пг/мл) плюс 2σ (стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 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
Цей метод (Y)	3.05	$y = 0.35 + 0.922(x)$	0.902
Референсний метод (X)	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.

14.4 Специфічність

Вплив перехресних речовин оцінювався при додаванні значної кількості речовин в різних концентраціях до сироваткової матриці. Перехресну реакційну здатність розраховували, отримуючи співвідношення між дозою інтерферуючої речовини та дозою трийодтироніну, необхідною для витіснення тієї ж кількості кон'югату.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
I-Трийодтиронін	1.0000	-
I - Тироксин	< 0.0002	10 мкг/мл
Йодотирозин	< 0.0001	10 мкг/мл
Діодотирозин	< 0.0001	10 мкг/мл
Діодотиронін	< 0.0001	10 мкг/мл
Фенилбутазон	< 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.ua

