

НАБІР ІФА
ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ
ТРИЙОДТИРОНІНУ (Т3U)

525-300, Т3U Test System

Каталог. №: **525-300**

Кількість : **96**

Виробник : **Monobind Inc., (США)**

Методика від **06-11-2012**

Версія **3**



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

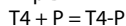
Тест призначений для виміру загальної кількості сайтів зв'язування для тиреоїдних гормонів в людських сироватці або плазмі в ІФА.

2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз (ТИП 5)

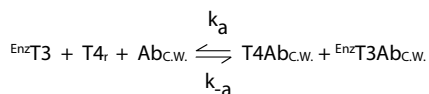
Необхідні реагенти, що вимагаються для твердофазового імуноферментного аналізу, іммобілізовані антитіла до тироксину, кон'югат ферменту з Т3, тироксин і зв'язуючий протеїн. При змішуванні ферментного кон'югату і тироксину із зразком відбувається реакція зв'язування між зв'язуючими білками пацієнта і внесеним тироксином, **але не з ферментним кон'югатом**. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



T4 - внесений тироксин (постійна кількість)

P - специфічні зв'язуючі протеїни (змінна кількість).

Внесений тироксин (Т4), не прореагувавши в цій реакції, потім конкурує з ферментним кон'югатом-Т3 за обмежене число нерозчинних сайтів зв'язування.



Ab_{c.w.} = Іммобілізовані антитіла (постійна кількість)

T4_r = Доданий Т4, не прореагувавши в реакції (1) (змінна кількість)

^{Enz}T3 = Кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

T4Ab_{c.w.} = Комплекс Тироксин-антитіло

^{Enz}T3 Ab_{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 фракція пов'язаних антитіл відділяється від незв'язаних фермент-антигену декантацією або аспірацією. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна зв'язуючій здатності зразка. Таким чином, при гіпотиреозі зв'язуючі білки відносно не насичені (що пов'язане з низьким рівнем тиреоїдних гормонів) і це призводить до підвищеного захоплення внесеного тироксину в порівнянні з еутиреоїдного зразками. Це веде до підвищеного зв'язування кон'югату фермент-Т3, яке обумовлене зниженою концентрацією доступного тироксину. При гіпертиреозі вірно зворотнє.

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються

A. Референсна людська сироватка – 1 мл/флакон

Чотири флакона референсної сироватки зв'язуючої здатності ненасиченого тиреоїдного гормону з концентраціями 18 (A), 25 (B), 35 (C) і 47 (D) %U. Зберігати при 2-8 °С. Містять консерванти. *Точні концентрації вказані на етикетках.

B. Ферментний реагент Т3U – 1.5 мл/флакон

Один флакон, що містить кон'югат трийодтиронін-пероксидаза хрому і тироксин в розчині альбуміну - стабілізуючій матриці. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

C. Буфер кон'югату Т3U – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить буфер, помаранчевий барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

D. Планшет, покритий антитілом Т4 – 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий овечою анти-тироксин сироваткою і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

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

F. Субстрат А – 7 мл у флаконі

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

G. Субстрат В – 7 мл у флаконі

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

H. Стоп-розчин – 8.0 мл у флаконі

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

I. Інструкція

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Диспенсери змінного об'єму (20-200 мкл) і (200-1000 мкл) для приготування розчинів субстрату і кон'югату.
4. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
6. Тестові пробірки для приготування Ферментного кон'югату та субстратів А та В.
7. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
8. Пластикові плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
9. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
10. Таймер.
11. Контрольні матеріали.

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

5. 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, NHS.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить кров; сироватка або плазма. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для 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 °С до 5 днів. 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 вимагається 0.05 мл зразка.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю, відповідні гіпо-, гіпер і еутиреоїдному діапазонам для відстеження характеристик набору. Ці

контролі 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. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Робочий реагент А - Розчин ТЗУ-ферментного кон'югата

Розбавте ТЗУ-ферментний кон'югат 1:11 буфером ТЗУ в підходящій ємності. Наприклад, змішайте 160 мкл кон'югата з 1.6 мл буфера для 16 лунок (вийде невеликий надлишок розчину). Цей розчин повинен бути використаний протягом 24 годин. Зберігати при 2-8 °С.

Загальна формула:

Необхідна кількість буфера = кількість лунок x 0.1

Необхідна кількість Ферментного кон'югата ТЗ = n лунок x 0.01, наприклад, = 16 x 0.1 = 1.6 мл для буфера ферментного кон'югата ТЗ/Т4 16 x 0.01 = 0.16 мл (160 мкл) для Ферментного кон'югата ТЗ

2. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °С) до 60 днів.

3. Робочий Субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °С.

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

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

9. 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 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 100 мкл Робочого реагенту А (розчину ТЗУ-ферментного кон'югата) у кожен 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 декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
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 кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
8. Додайте 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 відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

9. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
10. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл 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.**
11. 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.**

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення зв'язуючої здатності ненасиченого тиреотропного гормону в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх осередків як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних щільностей для кожного стандарту залежно від %ТЗ захоплення (%U) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте невідомі значення %ТЗU в невідомих зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція (1.690) перетинає стандартну криву при 26.6%U (див. мал.1).

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Значення (%U)
Калібратор А	A1	2.644	2.622	18
	B1	2.600		
Калібратор В	C1	1.888	1.880	25
	D1	1.872		
Калібратор С	E1	0.710	0.718	35
	F1	0.726		
Калібратор D	G1	0.265	0.256	47
	H1	0.247		
Контроль 1	A2	1.701	1.690	26.6
	B2	1.680		
Контроль 2	C2	0.330	0.314	45.5
	D2	0.298		

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

TU також може бути відображено як співвідношення TU. Розділіть %U на 30% для конвертації у співвідношення TU. Див приклад 2:

ПРИКЛАД 2

$$27.3\% U / 30\% = 0.910$$

Малюнок 1 (Див. оригінал інструкції).

11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

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

12. 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. 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.

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. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись 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 відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. Тест ТЗУ залежить від багатьох факторів: функції щитовидної залози та її регуляції, концентрації Трийодтироніну, зв'язаного з глобуліном (ТВГ) і зв'язування ТЗ з ТВГ. **Таким чином, визначення однієї лише концентрації ТЗУ не є достатнім для оцінки клінічного статусу.**
7. Індекс вільного тироксину (FTI), що є продуктом співвідношення Т-У і концентрації загального тироксину має більш прийнятне застосування в клініці як більш точна оцінка тиреоїдного статусу. Показники FTI компенсують різні умови, медикаменти, вплив вагітності або естрогенів, які впливають на ТРГ та рівні Т4, але не змінюють тиреоїдний статус. Перелік інтерферуючих ліків і умов, які впливають на тест ТЗУ, наведений у журналі американської Асоціації Клінічної хімії (10).

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Було проведено дослідження дорослої еутиреоїдної популяції цим набором і отримані наступні результати. Загальна кількість зразків – 85.

Таблиця 1
Очікувані значення для тесту ТЗУ

Тиреоїдний статус	%Т	Т-співвідношення
Еутиреоїдний	25 - 35	0.83 – 1.17
Гіпотиреоїдний або ТВГ надлишкове зв'язування	25	0.83
Гіпертиреоїдний або насиченість ТВГ	35	1.17

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, що тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору ТЗУ всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (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 (%U)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Низький	24	28.7	0.39	1.37
Нормальний	24	37.8	0.51	1.36
Високий	24	45.4	0.33	0.73

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (%U)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
Низький	10	28.4	0.45	1.6
Нормальний	10	37.1	0.65	1.8
Високий	10	45.7	0.52	1.1

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублікатах на протязі 10 днів.

14.2 Достовірність (Порівняння методів)

Справжній метод порівнювався з референсним радіоімунним методом. Використовувалися зразки від пацієнтів з гіпо-, еу- і гіпертиреозом (діапазон значень від 14 до 48 %U). Загальне число зразків було 120. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для ТЗ ІФА у порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	29.3	$y = 1.56 + 0.956 (x)$	0.972
Референсний	29.0		

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



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

