

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ТРИЙОДТИРОНІНУ МЕТОДОМ ІФА

T3-Uptake (T3U) Test System

Кат. №: 525-300A

Дата випуску інструкції: 06-11-2012

Версія: 3



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

1. ВСТУП

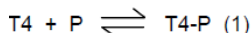
Призначення: Вимірювання загальної кількості сайтів зв'язування, доступних для тиреоїдних гормонів у сироватці або плазмі крові людини, за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу.

2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз (ТИП 5)

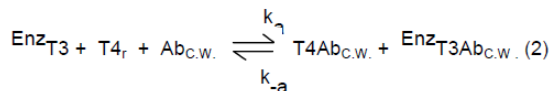
Необхідними компонентами для оцінки здатності зв'язування сироватки крові людини є кон'югат фермент-Трийодтиронін, тироксин, зв'язуючий білок (P) та іммобілізоване антитіло до тироксину (At). Після змішування ферментного кон'югату та тироксину зі зразком виникає реакція зв'язування між зв'язувачими білками пацієнта та доданим тироксином, **але не з ферментним кон'югатом**. Ця взаємодія представлена нижче:



T4 - Доданий тироксин (постійна кількість)

P - Специфічні зв'язуючі білки (змінна кількість).

Доданий тироксин (T4), який не зреагував в реакції 1, потім конкурує з кон'югатом фермент-Трийодтиронін за обмежену кількість нерозчинених сайтів зв'язування. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



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

T4_r = Доданий Тироксин, що не зреагував 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_n = константа швидкості асоціації

k_a = константа швидкості дисоціації

K = k_n/k_a = константа рівноваги

Після досягнення рівноваги фракцію, зв'язану з антитілом, відокремлюють від незв'язаного ферменту-антигену шляхом декантації або аспірації. Активність ферменту у фракції, зв'язаній з антитілами, прямо пропорційна зв'язувальній здатності зразка. Таким чином, при гіпотиреозі зв'язувальні білки є відносно ненасиченими (через низький рівень тиреоїдних гормонів), що призводить до більшого споживання доданого тироксину, ніж еутиреоїдного зразка. Це призводить до більш високого зв'язування кон'югату фермент-трийодтиронін, спричиненого зниженою концентрацією доступного тироксину. При гіпертиреозі все навпаки. Зв'язувальні білки відносно насичені тироксином (через високий рівень гормону щитовидної залози), що призводить до меншого споживання доданого тироксину. Залишок тироксину відносно значно вищий, ніж у еутиреоїдному зразку, що призводить до нижчого зв'язування антитіла фермент-антиген через посилення конкуренції тироксину за обмежені сайти антитіл.

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються

A. Референсна сироватка людини - 1 мл (мл)/флакон

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

B. Ферментний реагент Трийодтиронін-Uptake - 1.5 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить кон'югат трийодтиронін-пероксидаза хрому і тироксин в альбумін-стабілізуючій матриці. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

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

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

D. Планшет, покритий антитілом до Тироксину - 96 лунок

Один 96-луноквий мікропланшет, покритий антитілами до тироксину сироватки вівці і запакований в пакет з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

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

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-30 °C (°C).

F. Субстрат A - 7 мл (мл) у флаконі

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

G. Субстрат B - 7 мл (мл) у флаконі

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

H. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл) у флаконі

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

I. Інструкція

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 мкл (μl) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл (μl) 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.

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 °C (°C). 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, ВГС 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», 2-е видання, 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 (натщесерце). Кров слід збирати в пробірки з червоним ковпачком без добавок або антикоагулянтів.

Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

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 повторних циклів заморожування/заморожування. Для аналізу в дублях вимагається 0.05 мл (ml) зразка.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю, відповідні гіпо-, гіпер- і еутиреїдному діапазонам 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 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. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Робочий реагент А - Розчин реагенту Трийодтиронін-Uptake-Фермент

Розбавте реагент Трийодтиронін-Uptake-Фермент 1:11 буфером кон'югату Трийодтиронін-Uptake в підходящій ємності. Наприклад, змішайте 160 мкл (µl) кон'югату з 1.6 мл (ml) буфера для 16 лунок (вийде невеликий надлишок розчину). Цей розчин повинен бути використаний протягом 24 годин для досягнення максимальної ефективності аналізу. Зберігати при 2-8 °C (°C).

Загальна формула:

Необхідна кількість буфера = кількість лунок x 0.1

Необхідна кількість Трийодтиронін-Ферменту = n лунок x 0.01, наприклад, = 16 x 0.1 = 1.6 мл (ml) для буфера кон'югату Трийодтиронін загальний/Тироксин 16 x 0.01 = 0.16 мл (ml) (160 мкл (µl)) для Ферментного кон'югату Трийодтироніну

2. Промивний буфер

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

3. Розчин Робочого Субстрату

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 зберігайте при 2-8 °C (°C).

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

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

9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролю для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Додайте дозатором по 25 мкл (µl) відповідного стандарту, контролю та зразка у відповідні лунки.
3. Додайте по 100 мкл (µl) Робочого реагенту А (розчину Трийодтиронін-Uptake-Фермент) у кожен лунку.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його 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 (µl) промивного буфера (див. розділ «Підготовка 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 пляшка під тиском, наповнити кожен лунку до верху (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
8. Додайте по 100 мкл (µl) розчину Робочого субстрату в кожен лунку (див. «Підготовка реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності, 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 (µl) 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 (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Крива доза-відповідь використовується для встановлення здатності зв'язування ненасиченого тиреоїдного гормону в невідомих зразках.

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 %T3-Uptake (%U) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Щоб визначити %T3-Uptake для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на референсній відповіді та зчитайте %T-Uptake (%U) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомого можна усереднити, як зазначено). У наступному прикладі середнє поглинання (1.690) перетинає референсну криву при 26.6% U (див. рис. 1).

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	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		

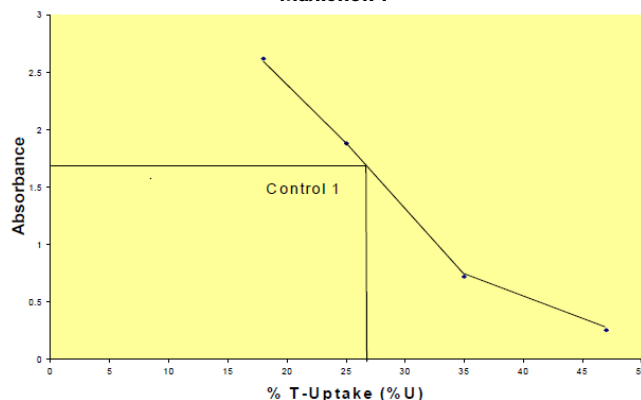
* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

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

ПРИКЛАД 2

$$27.3\% \text{ U} / 30\% = 0.910$$

Малюнок 1



Absorbance - Абсорбція
% T-Uptake (%U) - % T-Uptake (%U)
Control 1 - Контроль 1

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

MSDS та форму аналізу ризиків для цього продукту доступні за запитом у Monobind Inc.

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 - відповідно до вимог Директиви IVD 98/79/ЄС маркованих CE - для цього та інших наборів, виготовлених Monobind, може бути отриманий за запитом на електронну пошту 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. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі 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 відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. Тест T3-Uptake залежить від багатьох факторів: функції щитовидної залози та її регуляції, концентрації Тироксин-зв'язуючого глобуліну (ТЗГ) і зв'язування тиреотропних гормонів з ТЗГ. **Таким чином, визначення однієї лише концентрації T3-Uptake не є достатнім для оцінки клінічного статусу.**
7. Індекс вільного тироксину (ІВТ), який є добутком співвідношення T-Uptake і концентрації загального тироксину, отримав широке клінічне визнання як більш точна оцінка стану щитовидної залози. Значення ІВТ компенсує будь-який стан або препарат, наприклад вагітність або естрогени, які змінюють рівні ТЗГ і Тироксину, але не змінюють тиреометаболічний статус. Журнал Американської асоціації клінічних хіміків склав таблицю інтерферуючих і станів, які впливають на тест T3-Uptake.

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Було проведено дослідження еутиреоїдного дорослого населення (85 зразків) для визначення очікуваних значень T-Uptake та представлено в Таблиці 1.

Таблиця 1
Очікувані значення для Тест-системи T-Uptake

Тиреоїдний статус	%T- Uptake	T-співвідношення
Еутиреоїдний	25-35	0.83-1.17
Гіпотиреоїдний або надлишкове зв'язування ТЗГ	< 25	< 0.83
Гіпертиреоїдний або насиченість ТЗГ	> 35	> 1.17

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. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність Тест-системи T-Uptake AccuBind™ 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 (Значення в %U)

Зразок	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* (Значення в %U)

Зразок	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 дублях протягом 10 днів.

14.2 Достовірність (Порівняння методів)

Тест-систему T-Uptake AccuBind™ порівнювали з радіоімунним методом визначення T3-Uptake. Були використані біологічні зразки від гіпотиреоїдних, еутиреоїдних і гіпертиреоїдних популяцій і вагітних (значення коливаються від 14% до 48% U). Загальна кількість таких зразків становила 120. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для цього методу тестування T-Uptake AccuBind™ у порівнянні з референсним методом. Отримані дані відображені в Таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

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

Близькість середніх значень вказує лише на незначну похибку між цим методом і референсним методом. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції вказують на чудову узгодженість методів.



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

