

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ТРИЙОДТИРОНІН (Т-3)

Triiodothyronine (T-3) ELISA

Кат. №: EIA-1780

Дата випуску інструкції: 2017-05
Версія 6.0



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

Для використання в in Vitro діагностиці

Зберігати при 2-8 °С

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Цей набір призначений для кількісного визначення концентрації Трийодтироніну (Т3) у сироватці крові людини. Цей тест корисний для діагностики та лікування захворювань щитовидної залози, таких як гіпертиреоз.

2. ВСТУП

Тиреоїдні гормони, тироксин (Т4) і 3,5,3' Трийодтиронін (Т3) циркулюють в кров'яному потоці, в основному зв'язаними з протеїнами плазми, тироксин-зв'язуючим глобуліном (ТВГ). Концентрація Т3 значно менша за концентрацію Т4, але його метаболічна потенційність значно вища. Ці гормони, як і інші, виробляються щитовидною залозою, яка знаходиться на рівні щитовидного хряща по обидві сторони гортані. Щитовидна залоза та пов'язані з нею гормони є основним компонентом ендокринної системи. Вони мають потужний та важливий регуляторний вплив на ріст, диференціювання, клітинний метаболізм та загальний гормональний баланс тіла, а також на підтримку метаболічної активності та розвитку систем скелета та органів.

Визначення Т3, Т4 та ТТГ є важливими чинниками діагностики захворювань щитовидної залози. Визначення Т3 корисно для моніторингу як пацієнтів під час лікування гіпертиреозу, так і пацієнтів, які припинили анти-тиреоїдну терапію. Це особливо важливо для розмежування між еутиреозом і гіпертиреозом.

Вимірювання Т3 виявило варіант гіпертиреозу у тиреотоксичних пацієнтів з підвищеними значеннями Т3 та нормальними значеннями Т4. Подібним чином збільшення Т3 без збільшення Т4 часто є попередником періодичного тиреотоксикозу у пацієнтів, які раніше лікувалися. На додаток до гіпертиреозу рівень Т3 підвищений у вагітних жінок та у жінок, які отримують оральні контрацептиви або лікування естрогеном.

Клінічне значення Т3 також виявляється у пацієнтів, у яких еутиреїдний вплив обумовлений лише нормальним Т3, хоча значення Т4 є аномальними.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

В цьому аналізі вторинне антитіло (козячі анти-мишачі IgG) нанесено в мікропланшетні лунки. Виміряна кількість сироватки пацієнта, відома кількість мишачого моноклонального анти-Т3 антитіла і незмінна кількість Т3, кон'югованого з пероксидазою хрому, додається в лунки. Під час інкубації, мишаче анти-Т3 антитіло зв'язується з вторинним антитілом в лунці. Т3 і кон'югат фермент-Т3 конкурують за обмежену кількість сайтів зв'язування на анти-Т3 антитілі. Після 60 хвилин інкубації при кімнатній температурі, лунки промиваються 5 разів водою для видалення незв'язаного кон'югату Т3. Потім додається розчин ТМБ і інкубується 20 хвилин при КТ, в результаті розвивається блакитне забарвлення. Розвиток кольору зупиняється додаванням Стоп-розчину і абсорбція вимірюється спектрофотометром при 450 нм. Інтенсивність кольору пропорційна кількості присутнього ензиму і обернено пропорційна кількості немаркованих Стандартів Т3, проаналізованих таким же способом. Потім обчислюється концентрація Т3 в невідомому зразку.

4. МАТЕРІАЛИ ТА РЕАГЕНТИ, ЩО ВХОДЯТЬ ДО СКЛАДУ НАБОРУ

1. **Планшет з лунками**, покритими козячими анти-мишачими IgG, 96 лунок.
2. **Концентрат ферментного кон'югату (11X)**, 1,3 мл Містить кон'югат Т3-HRPO з буфером TRIS, pH = 7.60 і ProClin-300.
3. **Розчинник ферментного кон'югату**, 1 пляшка, 13 мл Містить ANS, буфер TRIS, pH = 7.60 і ProClin-300.
4. **Набір референтних Стандартів (1.0 мл/флакон)** Містять 0-0.75-1.5-3.0-6.0 і 10.0 нг/мл Трийодтироніну у вільній від Т3/Т4 сироватці людини та ProClin-300.

5. **Реагент антитіл до Т3**, 1 флакон, 7 мл Містить моноклональні антитіла до Т3 у фосфатному буфері, pH = 7.60 та ProClin-300
6. **Реагент ТМБ**, 1 флакон, 11 мл Містить 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ), стабілізований у буферному розчині.
7. **Стоп-розчин (1NHCl)**, 1 флакон, 11 мл Містить розведену хлористоводневу кислоту.

5. МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ВХОДЯТЬ ДО НАБОРУ

1. Дистильована або деіонізована вода.
2. Точні піпетки: 25, 100, 200 мкл і 1 мл.
3. Одноразові наконечники для піпеток.
4. Мікропланшетний рідер зі зчитуванням абсорбції при 450 нм.
5. Промокальний папір.
6. Графічний папір.
7. Вортексний міксер або аналог.
8. Контрольний матеріал (контрольна сироватка BioRad Lyphocheck).

6. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. УВАГА: Цей набір містить матеріал людського походження. Вихідний матеріал, який використовується для виробництва цього набору, дав негативний результат до HBsAg, ВІЛ 1/2 і ВГС за затвердженнями FDA методикам. Однак, не один метод не може повністю гарантувати відсутність цих агентів. Таким чином, всі продукти крові людини, в тому числі зразки сироватки, слід розглядати як потенційно інфекційні. Звернення з ними повинно бути визначено відповідними національними посібниками чи правилами з безпеки в поводженні з біологічно небезпечними речовинами.
2. Уникати контакту з 1N HCl. Це може викликати роздратування шкіри і опіки. Якщо контакт відбувається, промити великою кількістю води і звернутися до лікаря якщо роздратування не проходить.
3. Не використовувати реагенти після закінчення терміну придатності і не змішувати або використовувати компоненти з наборів з іншими серійними номерами.
4. Повертати ковпачки на флакони з реагентами відразу після використання. Не міняти ковпачки.
5. Розчини, що містять добавки і консерванти, такі як азид натрію, не повинні використовуватися в ферментативній реакції.
6. Не піпетувати реагенти ротом.
7. Для діагностичного використання *in vitro*.

7. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

1. Зберігати закритий набір при 2-8 °С після отримання і коли він не використовується, до закінчення терміну, зазначеного на етикетці. Термін придатності зазначений на етикетці.
2. Тримати планшет в запечатаному пакеті з осушувачем для мінімізації впливу вологого повітря.

8. ЗБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

1. Кров повинна бути зібрана з використанням стандартної техніки венепункції, а сироватка повинна бути відокремлена від червоних клітин настільки швидко, наскільки це можливо. Уникати сильно гемолізованих, ліпемічних або каламутних зразків.
2. Зразки плазми, зібрані в пробірки з EDTA, гепарином або оксалатом, можуть впливати на процедуру аналізу.
3. Зразки повинні бути закриті і можуть зберігатися до 48 годин при температурі 2-8 °С до дослідження. Зразки, що зберігаються більш тривалий час (до 6 місяців) повинні бути заморожені тільки один раз при -20 °С до аналізу. Розморожені зразки повинні бути перевернуті кілька разів до початку досліджень.

9. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Перед використанням довести всі реагенти до кімнатної температури (18-25 °С).
2. Всі реагенти необхідно перемішати шляхом обережного перевертання перед використанням. Не провокувати піноутворення.
3. Підготовка **Реагенту Робочого Кон'югату Т3-HRPO**: додати 0.1 мл концентрату кон'югату Т3-HRPO (11X) до 1.0 мл Розчинника Кон'югату Т3 (розведення 1:10) і добре змішати. Кількість розбавлених кон'югатів залежить від об'єму аналізу. Реагент Робочого Кон'югату стабільний при 4 °С мінімум до 24 годин.

10. ПРОЦЕДУРНІ ЗАУВАЖЕННЯ

1. Ручне піпетування: рекомендується використовувати не більше 32 лунок для виконання кожної процедури аналізу. Рекомендується багатоканальна піпетка.
2. Автоматизоване піпетування: в кожній процедурі аналізу може використовуватися 96-луноковий планшет. Однак, рекомендується завершити піпетування всіх стандартів, зразків і контролів протягом 3 хвилин.

- Всі стандарти, зразки і контролю повинні використовуватися одночасно в двох примірниках, дотримуючись всюди однакових умов дослідження.
- Рекомендується проводити зчитування лунок протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

11. ІНСТРУМЕНТАРІЙ

Мікропланшетний рідер з шириною доріжки 10 нм або менше і діапазоном ОЩ від 0 до 2 OD або вище при 450 нм є прийнятним для вимірювання абсорбції.

12. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Закріпити потрібну кількість лунок з антитілами в рамку для стрипів. Приготувати аркуш паперу для запису ідентифікації зразків.
- Розкапати по 50 мкл стандартів, зразків і контролів в відповідні лунки.
- Внести по 50 мкл реагенту антитіл Т3 в кожен лунку. Ретельно перемішувати протягом 30 секунд.
- Додати по 100 мкл **Реагенту Робочого Кон'югату** в кожен лунку. Ретельно перемішувати протягом 30 секунд. **Важливо домогтися повного перемішування на етапах 3 і 4.**
- Інкубувати при кімнатній температурі (18-25 °C) протягом 60 хв.
- Видалити інкубаційну суміш, витрусивши вміст планшета в контейнер для відходів.
- Промити вміст лунок дистильованою або деіонізованою водою 5 раз і видалити (не використовувати проточну воду).
- Різно перевернути планшет на промокальний папір або паперові рушники для видалення всіх залишків рідини.
- Внести по 100 мкл реагенту ТМБ в кожен лунку. Акуратно перемішати протягом 5 секунд.
- Інкубувати при кімнатній температурі в темному місці протягом 20 хвилин.
- Зупинити реакцію додаванням в кожен лунку по 100 мкл стоп-розчину.
- Акуратно перемішувати протягом 30 секунд. Переконайтеся в повній зміні синього забарвлення на жовту.
- Виміряти оптичну щільність лунок за допомогою мікропланшетного рідера при 450 нм протягом 15 хв.

13 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Розрахувати середні значення поглинання (OD450) для кожного набору стандарту, контрольних сироваток і зразків в дублі.
- На папері для графіків побудувати калібрувальну криву, відкладаючи на вертикальній осі (Y) значення поглинання для кожного референтного стандарту проти його концентрації в нг/мл на горизонтальній осі (X).
- За допомогою середніх значень поглинання для кожного зразка по калібрувальній кривій визначити відповідну концентрацію Т3 в нг/мл.
- Будь-які нерозбавлені зразки повинні бути далі відкориговані відповідним коефіцієнтом розведення.

14 КАЛІБРУВАННЯ АНАЛІЗУ

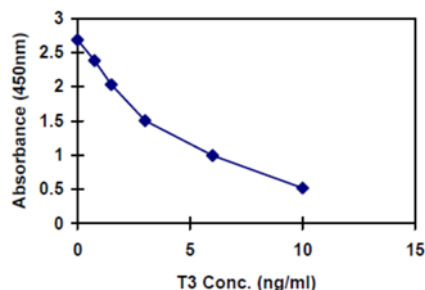
Стандарти Т3 відкалібровані в порівнянні з набором PIA загального Т3 компанії «Діагностик Продактс Корпорейшен». Точність цього калібрування становить $100 \pm 5\%$. Таким чином, точність зразків пацієнтів, аналізованих набором ІФА загального Т3 (EIA-1780) може відхилитися на $\pm 5\%$.

14.1 Приклад типової калібрувальної кривої

Результати типового оптичного зчитування щільності стандартів при 450 нм вказано на у-осі по відношенню до концентрації загального Т3 (нг/мл) показаної на осі x, представлені нижче.

ПРИМІТКА: калібрувальна крива представлена тільки для ілюстрації і не повинна використовуватися для обчислення невідомих значень. Кожна лабораторія повинна представити свої власні дані і калібрувальну криву при виконанні кожного аналізу. Крім того, значення поглинання (450 нм) можуть відрізнятися в зв'язку з інкубацією при різниці кімнатної температури в різних лабораторіях.

Загальний Т3 (нг/мл)	Поглинання (450 нм)
0.0	2.685
0.75	2.381
1.5	2.028
3.0	1.502
6.0	0.992
10.0	0.518



15. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Набір ІФА загального Т3 (EIA-1780) був використаний в дослідженні 41 пацієнта з гіпотиреозом, 64 еутиреодних і 49 гіпертиреодних пацієнтів (як було визначено лабораторним аналізом лікарні) в одному географічному місці. Діапазон, як визначено від нижчого до вищого значення випробуваних зразків пацієнтів, склав від 0,14 до 6,20 нг/мл і були отримані наступні діапазони:

Гіпотиреоз:	< 0.8 нг/мл
Еутиреоз:	0.8 – 1.9 нг/мл
Гіпертиреоз:	> 1.9 нг/мл

Ці діапазони відповідають тим, які запропоновані іншими виробниками. В цілому, рівні загального Т3 сироватки, як правило, паралельні змінам в рівнях сироватки основних зв'язуючих білків, тироксин зв'язуючого глобуліну (ТЗГ).

Підвищені рівні Т3 можуть виникнути при гіпотиреозі осіб, що проходять заміну терапії. Недостатній прийом йоду також може викликати підвищення рівнів Т3 в сироватці. Рівні Т3 нижче, ніж зазвичай в пуповинній крові, а також мають тенденцію до зниження в літньому віці. Рекомендується, щоб лабораторії визначали значення відповідно до особливостей географічних і популяційних відмінностей, характерних для пацієнтів, яких вони досліджують.

Наступні умови і методи лікування можуть змінити рівні ТЗГ:

Підвищений ТЗГ в сироватці

- Вагітність
- Естрогенна терапія (включаючи оральні контрацептиви)
- Фенотіазини
- Вірусний гепатит
- Гостра інтермітуюча порфірія
- Мікседема
- Спадкові причини

Понижений ТЗГ в сироватці

- Андрогени
- Кортикостероїди
- Анаболічні стероїди
- Активна акромегалія
- Нефритичні синдроми
- Стрес, загальна слабкість або хірургічне втручання
- Недоїдання

16 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

16.1 Точність

Статистичне дослідження, в якому порівнювались набір Т3 (EIA-1780) з набором Abbott AxSym Total T3, використовувало 67 зразків пацієнтів (діапазон = 0.32 – 5.9 нг/мл) і продемонструвало хорошу кореляцію з набором, як показано нижче:

К-сть = 67
 Коефіцієнт кореляції = 0.906
 Схил = 0.920
 Перетин = -0.229
 (EIA-1780) Середнє значення = 1.24 нг/мл
 Abbott Середнє значення = 0.91 нг/мл

Додаткове дослідження, в якому порівнювався набір Т3 (EIA-1780) з набором виробництва Монобайнд Загальний Т3 (n = 80, діапазон = 0.14 – 6.2 нг/мл) також корелює добре, як показано нижче:

К-сть = 80
 Коефіцієнт кореляції = 0.993
 Схил = 1.004
 Перетин = -0.084
 (EIA-1780) Середнє значення = 1.21 нг/мл
 Monobind Середнє значення = 1.13 нг/мл

16.2 Чутливість

Чутливість цього тесту визначається як найнижча концентрація Т3, яка не дорівнює 0 нг/мл і розраховується з 95% довірчих інтервалів стандартного поглинання 0 нг/мл. Цей метод надійно визначає концентрацію Т3 на рівні 0.2 нг/мл.

16.3 Точність

16.3.1 Точність в аналізі

Точність в аналізі визначалася повторними визначеннями трьох різних контрольних сироваток в одному аналізі.

Serum Sample	1	2	3
Number of Replicates	20	20	20
Mean T3 (ng/mL)	0.85	2.48	4.41
Standard Deviation	0.08	0.10	0.14
Coefficient of Variation (%)	9.6%	4.1%	3.2%

16.3.2 Точність між аналізами

Точність вимірювання між аналізами визначалася повторними вимірами трьох різних зразків сироватки через серію індивідуально відкаліброваних аналізів.

Serum Sample	1	2	3
Number of Replicates	20	20	20
Mean T3 (ng/mL)	0.79	2.53	4.10
Standard Deviation	0.08	0.08	0.06
Coefficient of Variation (%)	10.3%	3.2%	1.4%

16.4 Дослідження Відновлення та Лінійності

16.4.1 Відновлення

Різні зразки сироватки з відомими рівнями Т3 об'єднували і аналізували в двох примірниках. Середнє значення відновлення становило 106%.

Expected Concentration (ng/mL)	Observed Concentration (ng/mL)	% Recovery
5.05	4.1	99%
2.71	2.73	101%
1.46	1.52	104%
0.68	0.65	96%
Mean Recovery #1 = 100 %		
5.81	6.16	106%
3.02	3.17	105%
1.54	1.75	114%
0.71	0.84	119%
Mean Recovery #2 = 111 %		

16.4.2 Лінійність

Два зразки були серійно розбавлені нульовим стандартом Т3 для визначення лінійності. Середнє значення лінійності становило 99%.

#	Dilution	Expected Conc. (ng/mL)	Observed Conc. (ng/mL)	% Expected
1.	Undiluted	----	6.06	----
	1:2	3.03	3.05	101%
	1:4	1.51	1.46	97%
	1:8	0.75	0.68	91%
Average = 96%				
2.	Undiluted	----	5.66	----
	1:2	2.83	2.86	101%
	1:4	1.42	1.55	109%
	1:8	0.71	0.67	94%
Average = 101%				

16.5 Специфічність

Наступні гормони були перевірені на перехресну реактивність:

HORMONE TESTED	CONCENTRATION	PRODUCED COLOR INTENSITY EQUIVALENT TO T3 (ng/mL)
<i>Triiodo-L-Thyronine</i>	1.0 ng/mL	1.0
	3.0 ng/mL	3.0
	6.0 ng/mL	6.0
	8.0 ng/mL	8.0
<i>Triiodo-D-Thronine</i>	0.5 ng/mL	0.45
	1.0 ng/mL	0.81
	2.0 ng/mL	2.37
	4.0 ng/mL	4.14
<i>L-Thyroxine (T4)</i>	4.5 µg/dL	0
	9.0 µg/dL	0.22
	18.0 µg/dL	0.53
	36.0 µg/dL	1.35
<i>D-Thyroxine (T4)</i>	2.0 µg/dL	0.32
	4.0 µg/dL	0.40
	8.0 µg/dL	0.55

<i>Triiodothyroacetic Acid</i>	2.5 ng/mL	3.47
	5.5 ng/mL	6.53
	10.0 ng/mL	>8.0
	20.0 ng/mL	>8.0
<i>Monoiodotyrosine</i>	1,000 ng/mL	0
	10,000 ng/mL	0.17
	50,000 ng/mL	1.96
	100.0 ng/mL	>8.0
<i>Diiodotyrosine</i>	1,000 ng/mL	0.08
	10,000 ng/mL	0.12
	50,000 ng/mL	0.58
<i>Methimazole</i>	1,000 ng/mL	0.05
	50,000 ng/mL	0.06
	500,000 ng/mL	0.25
<i>5,5'-Diphenylhydantoin</i>	1,000 ng/mL	0
	10,000 ng/mL	0.03
<i>Phenylbutazone</i>	10,000 ng/mL	0
	50,000 ng/mL	0
	1,000,000 ng/mL	0.36
<i>6-n-Propyl-2-Thiouracil</i>	10,000 ng/mL	0.10
	100,000 ng/mL	1.48
	250,000 ng/mL	1.66
<i>Salicylic Acid</i>	5,000 ng/mL	0
	500,000 ng/mL	0
	1,000,000 ng/mL	0.28
<i>Acetylsalicylic Acid</i>	5,000 ng/mL	0
	500,000 ng/mL	0
	1,000,000 ng/mL	0

17. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Важливо:** особи, які отримують замісну терапію щитовидної залози таку як трийодтирооцтова кислота або трийодтирооцтова кислота, можуть дати помилково високі значення Т3 в цьому дослідженні. Багато інших умов, які не пов'язані із захворюванням щитовидної залози, можуть привести до аномальних значень Т3 (див. Очікувані результати).
- Надійні і відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу проводиться з повним розумінням інструкції набору і з дотриманням належної лабораторної практики.
- Зразки сироватки з концентраціями Т3 вище 10 нг/мл повинні бути розведені нульовим стандартом, щоб відповідати діапазону аналізу, і повторно проаналізовані. Потім отримане значення повинно бути помножене на коефіцієнт розведення, щоб отримати фактичне значення сироватки.
- Жовтяничні зразки із значенням білірубину до 5 мг/дл не впливають на аналіз.
- Рівні доданого гемоглобіну до 100 мг/дл не показали впливу на значення Т3.
- Результати, отримані від використання цього набору, повинні застосовуватися тільки як доповнення до інших діагностичних процедур і інформації, яка доступна лікарю.
- Процедура промивання вкрай важлива. Недостатня промивка призводить до низької точності і завищеним зчитуванням абсорбції.

18. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб низький, середній і високий контрольні зразки (контроль) використовувалися в кожній калібрувальній кривій для перевірки якості аналізу. Для забезпечення належного виконання, статистично значуща кількість контролів повинна аналізуватися для визначення середніх значень і прийнятних діапазонів. Контролі, що містять азид натрію, не повинні використовуватися.



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

