

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ЗАГАЛЬНИЙ ТРИЙОДТИРОНІН ELISA

T3 Total ELISA

Каталог. №: **EIA-4569**
Кількість : **96**

Дата випуску інструкції: **10-2016**
Версія **8.0**



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

1 ВВЕДЕННЯ

1.1 Призначення

Даний набір являє собою імуноферментний аналіз для кількісного *in vitro* діагностичного вимірювання Т3 загального (трийодтиронін) у сироватці та плазмі.

1.2 Короткий опис та пояснення

Вимірювання концентрації трийодтироніну в сироватці, як правило, розглядається як цінний інструмент для діагностики дисфункції щитовидної залози. Це значення послужило поштовхом для значного вдосконалення методології аналізу, яке відбулося за останні два десятиліття. Поява моноспецифічної антисироватки та відкриття блокуючих агентів до білків сироватки, що зв'язують Т3, дозволили розробити процедурно прості радіоімуноаналізи (1,2).

2 ПРИНЦИП ТЕСТУ

Даний набір являє собою твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), який базується на принципі конкурентного зв'язування.

Мікротитрувальні лунки покриті поліклональним антитілом кози до миші. Стандарти, контролю та сироватку пацієнта інкубують разом з Реагентом для аналізу, що містить моноклональні антитіла до Т3. У наступній інкубації з Кон'югатом ендогенний Т3 зразка пацієнта конкурує з кон'югатом пероксидази хрому Т3 за обмежену кількість нерозчинених сайтів зв'язування.

Після інкубації незв'язаний кон'югат змивається.

Кількість зв'язаного кон'югату пероксидази обернено пропорційна концентрації Т3 у зразку. Після додавання розчину субстрату інтенсивність забарвленого кольору обернено пропорційна концентрації Т3 у зразку пацієнта.

3 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Набір призначений тільки для *in vitro* діагностики. Тільки для професійного використання.
2. Всі реагенти цього набору, які містять сироватку або плазму людини, були протестовані і показали негативний результат на HIV I/II, HBsAg та HCV за методами схваленим FDA. Однак, всі реагенти слід вважати потенційно небезпечними під час використання та утилізації.
3. Перед початком дослідження повністю й уважно прочитайте інструкцію. Використовуйте дійсну версію інструкції, яка постачається з набором. Переконайтеся, що вам все зрозуміло.
4. Мікротитровий планшет складається зі відривних смужок. Невикористані лунки повинні зберігатися при 2-8 °C в пакеті з фольги і використовуватися з рамкою, що надається.
5. Піпетування зразків та реагентів повинне здійснюватися якомога швидше і з однаковими часовими інтервалами.
6. Використовуйте контейнери тільки для окремих реагентів. Це особливо стосується субстрату. Використовуючи резервуар для розчину субстрату, який раніше використовувався для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення розчину. Не виливати реагенти назад у флакони, оскільки це може призвести до забруднення.
7. Змішуйте вміст лунок ретельно, щоб забезпечити хороші результати випробувань. Не використовуйте повторно мікролунки.
8. Не дозволяйте лункам висохнути; додавайте реагенти негайно після завершення етапу промивання.
9. Дозволити реагентам нагрітися до кімнатної температури (21-26 °C) перед початком випробування. Температура буде впливати на показання оптичної щільності аналізу. Проте, значення для зразків пацієнтів не будуть порушені.
10. Ніколи не піпетувати ротом і уникайте контакту реагентів і зразків зі шкірою і слизовими оболонками.
11. Не палити, не їсти, не пити і не застосовувати косметику в тих місцях, де обробляються зразки або реагенти набору.

12. Одягати одноразові латексні рукавички при роботі зі зразками і реагентами. Мікробне забруднення реагентів чи зразків може давати помилкові результати.
13. Роботи зі зразками та реагентами повинні здійснюватися відповідно до процедур, визначених відповідними національними правилами біологічної безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
15. Всі зазначені обсяги повинні бути виконані відповідно до протоколу. Оптимальні результати випробувань будуть отримані тільки при використанні каліброваних піпеток і зчитувачів мікропланшетів.
16. Не слід змішувати або використовувати компоненти з наборів з різними номерами лотів. Рекомендується не змінювати місцями лунки різних пластин навіть одного і того ж лоту. Набори можуть транспортуватися або зберігатися в різних умовах і зв'язують характеристики планшетів можуть давати дещо інші результати.
17. Уникайте контакту зі *Стоп-розчином* - 0.5 М H₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри або опіки.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND та/або MIT в якості консервантів. У випадку попадання в очі чи на шкіру негайно промити водою.
19. Розчин субстрату ТМБ має подразнюючий ефект на шкіру та слизові. У разі контакту, промийте очі з великим об'ємом води і шкіру з милом і великою кількістю води. Промийте забруднені об'єкти перед повторним використанням. У разі вдихання реагентів, виведіть людину на свіже повітря.
20. Хімікати і приготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи.
21. Для отримання інформації про небезпечні речовини, включені в набір, будь ласка, зверніться до Паспорту безпеки. Паспорти безпеки для даного продукту надаються за запитом безпосередньо від DRG.

4 КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитрові лунки**, 12 x 8 (відривні) смужки, 96 лунок; Лунки покриті антитілом кози проти мишачого (поліклональне).
2. **Стандарт (Стандарт 1-5)***, 6 флаконів, 0.75 мл, готові до використання; Концентрація: 0 – 0.5 – 1.0 – 2.5 – 5.0 – 10.0 нг/мл Містить нертутний консервант.
3. **Контроль низький та високий**, 2 флакони, по 0.75 мл кожен, готові до використання; Значення та діапазони контролю дивитися на етикетці флакону або у Паспорті КЯ. Містить нертутний консервант.
4. **Реагент для аналізу**, 1 флакон, 6 мл, готовий до використання, Містить буфер, інгібітори зв'язуючого білка та анти-Т3 mAb. Містить нертутний консервант.
5. **Ферментний кон'югат**, 1 флакон, 6 мл, готовий до використання, Т3, кон'югований з пероксидазою хрому. Містить нертутний консервант.
6. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 12 мл, готовий до використання, Тетраметилбензидин (ТМБ).
7. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0.5 М H₂SO₄. Уникайте контакту зі стоп-розчином. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
8. **Промивний розчин**, 1 флакон, 30 мл (Концентрат 40X), дивіться розділ «Приготування реагентів».

Примітка: Додатковий *Стандарт 0* для розведення зразків доступний за запитом.

4.2 Необхідне обладнання, що не постачається

- Мікротитровий відкалібрований рідер (450 нм ± 10 нм).
- Відкалібровані регульовані точні мікродозатори.
- Абсорбуючий папір
- Деіонізована або дистильована вода
- Таймер
- Напівлогарифмічний графічний папір або програмне забезпечення для обробки даних

4.3 Умови зберігання

За умови зберігання при температурі 2-8 °C невідкриті реагенти зберігатимуть реактивність до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти слід зберігати при температурі 2-8 °C. Мікролунки повинні зберігатися при температурі 2-8 °C. Після відкриття мішечка із фольги потрібно знову його герметично закрити. Відкритий набір стабільний 2 місяці за умови зберігання, як вказано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість смужок до кімнатної температури.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40X концентрованого Промивного розчину. Розведіть 30 мл концентрованого Промивного розчину 1170 мл деіонізованої води, щоб отримати кінцевий об'єм 1200 мл. Розведений Промивний Розчин стабільний протягом 2 тижнів при кімнатній температурі.

4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору слід проводити відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Паспорті Безпеки Даних.

4.6 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Сильно пошкоджені компоненти не слід використовувати. Їх слід зберігати до кінцевого рішення. Після цього їх потрібно утилізувати відповідно до офіційних вимог.

5 ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватка або плазма (ЕДТА-, або гепаринова плазма) можуть використовуватись в даному аналізі.

Не слід використовувати гемолітичні, жовтяничні або ліпемічні зразки.

Зверніть увагу: Зразки, які містять азид натрію не можна використовувати в аналізі.

5.1 Забір Зразка

Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки); дозвольте їй згорнутись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного зсідання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для зсідання крові.

Плазма:

Цільна кров повинна бути зібрана в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянт (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідною підготовкою плазми) і центрифугувана відразу після збору.

5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки закриті кришками і зберігати до **48 годин** при температурі 2-8 °C перед аналізом. Зразки, які зберігаються на протязі більш тривалого часу (до 30 днів) мають бути заморожені тільки один раз при температурі від -20 °C перед аналізом. Перед аналізом, розморожені зразки слід кілька раз інвертувати.

5.3 Розведення зразків

Якщо в початковому аналізі виявлено, що зразок містить більше, ніж найвищий стандарт, то зразки можна розвести *Стандартом 0* і повторно проаналізувати, як описано в Процедурі аналізу.

Для розрахунку концентрацій слід враховувати цей коефіцієнт розведення.

Наприклад:

а) 1:2 розведення: 30 мкл зразка + 30 мкл *Стандарту 0* (добре перемішати).

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Важливо довести всі реагенти, зразки та контролі до кімнатної температури перед початком дослідження. Усі реагенти слід перемішати без утворення піни.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові одноразові наконечники для пластикових дозаторів для кожного стандарту, контролю або зразка, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки закріплені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однаковий інтервали часу.
- За загальним правилом, ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

6.2 Процедура дослідження

Кожен пробіг повинен включати стандартну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у штативі.
2. Внесіть **50 мкл Стандарту, контролю та зразка новими одноразовими наконечниками** у відповідні лунки. Важливо, спочатку додати стандарти або зразки перед додаванням Реагенту.
3. Внесіть **50 мкл Реагенту для аналізу** в кожну лунку. Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. На цьому етапі дуже важливо добре перемішати.
4. Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі (20-27 °C).
5. Внесіть **50 мкл Ферментного кон'югату** у кожну лунку. Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. На цьому етапі дуже важливо добре перемішати.
6. Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі (20-27 °C).
7. Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки **5 разів** розведеним Промивним Розчином (300 мкл на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
Примітка:
На чутливість і точність цього аналізу помітно впливає правильне виконання процедури миття!
8. Додайте **100 мкл Розчину Субстрату** у всі лунки.
9. Інкубуйте **10 хвилин** при кімнатній температурі (20-27 °C).
10. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл Стоп Розчину** в кожну лунку.
11. Визначте абсорбцію (ОЩ) при **450 ± 10nm** за допомогою мікротитрового планшет-рідера **протягом 30 хвилин** після додавання *Стоп Розчину*.

6.3 Обчислення результатів

1. Обчисліть середні значення поглинання для кожного набору стандартів, контролів та зразків пацієнтів.
2. За допомогою напівлогарифмічного графічного паперу побудуйте стандартну криву, побудувавши графік середнього поглинання, отриманий від кожного стандарту, до концентрації зі значенням поглинання на вертикальній осі (Y) та концентрації на горизонтальній (X) осі.
3. Використовуючи середнє значення поглинання для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію за стандартною кривою.
4. Автоматизований метод: Результати в Інструкції з використання були розраховані автоматично з використанням кривої 4 параметрів. (Найкращими методами є 4 Parameter Rodbard або 4 параметри Marquardt.) Інші функції обчислення даних можуть дати дещо інші результати.
5. Концентрацію зразків можна зчитати безпосередньо з цієї стандартної кривої. Зразки з концентрацією, вищою, ніж концентрація найвищого стандарту, повинні бути додатково розведені або подані як > 10 нг/мл. Для розрахунку концентрацій слід враховувати цей коефіцієнт розведення.

6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані призначені лише для демонстрації і не можуть використовуватися замість генерації даних на момент аналізу.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0.0 нг/мл)	1.89
Стандарт 1 (0.5 нг/мл)	1.42
Стандарт 2 (1.0 нг/мл)	1.13
Стандарт 3 (2.5 нг/мл)	0.58
Стандарт 4 (5.0 нг/мл)	0.36
Стандарт 5 (10.0 нг/мл)	0.20

7 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Настійно рекомендується кожній лабораторії визначати свої власні показники норм та патологій. У дослідженні, проведеному на дорослому населенні з еутирозом з використанням набору DRG ІФА ТЗ загального, спостерігаються наступні значення:

Населення	Дійсна к-сть	Діапазон (нг/мл)	Середнє (нг/мл)	2.5 ^а - 97,5 ^а процентиль (нг / мл)	Медіан (нг/мл)
Жінки та чоловіки	140	0.63-1.99	1.19	0.75 – 1.70	1.18

Одні результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Результати слід співставляти з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

Загальна концентрація трийодтироніну в сироватці крові залежить від безлічі факторів: функції щитовидної залози та її регуляції, концентрації тироксина зв'язуючого глобуліну (ТВГ) та зв'язування трийодтироніну з ТВГ (3, 4). Таким чином, лише загальної концентрації трийодтироніну недостатньо для оцінки клінічного стану. Зниження загальних значень трийодтироніну виявляється при захворюваннях, де втрачається білок, деяких захворюваннях печінки та при застосуванні тестостерону, дифенілгідантоїну або саліцилатів.

8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Хороша лабораторна практика вимагає, щоб контроль запускати з кожною калібрувальною кривою. Статистично, значна кількість контролів повинна бути проаналізована для встановлення середніх значень та допустимих діапазонів, щоб забезпечити належні показники.

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних та федеральних правил. Контрольні зразки рекомендується використовувати для забезпечення щоденної достовірності результатів. Використовуйте контрольні як на нормальному, так і на патологічному рівні. Контролі та відповідні результати лабораторії контролю якості зазначені в сертифікаті контролю якості, доданому до набору. Значення та діапазони, зазначені на паспорті контролю якості, завжди стосуються поточної партії набору і повинні використовуватися для безпосереднього порівняння результатів.

Також, рекомендується використовувати національні або міжнародні програми оцінки якості, щоб забезпечити точність результатів.

Використовуйте відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень та тенденцій. Якщо результати аналізу не відповідають встановленим допустимим діапазонам контрольних матеріалів, результати пацієнта слід вважати недійсними.

У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні аспекти: прилади для піпетування, фотометр, терміни придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Після перевірки вищевказаних пунктів, не знаходячи будь-які помилки, зверніться до дистриб'ютора або DRG безпосередньо.

9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0.1 – 10 нг/мл.

9.2 Специфічність антитіл (Перехресна реактивність)

Наступні речовини тестували на перехресну реакційну здатність аналізу:

Речовина	Перехресна реактивність (%)
I-Трийодтиронін	100
I-Тироксин	0.37
Зворотний Т3	0.75
D-тироксин	0.1
3,5-діодо-L-тирозин	0.2
4-феноксифенол	0.2

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість DRG ELISA розраховувалася шляхом додавання 2 стандартних відхилень від середнього значення 20 повторів аналізу Стандарту 0 (S0) і становить < 0.1 нг/мл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 В аналізі

Мінливість в аналізі показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	20	1.15	6.61
2	20	1.69	6.54
3	20	2.85	3.59

9.4.2 Між аналізами

Мінливість між аналізами показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	10	0.94	6.37
2	10	1.52	5.23
3	10	2.86	6.73

9.5 Відновлення

До зразків додавали розчини Т3 з відомими концентраціями у співвідношенні 1: 1.

% відновлення розраховували множенням співвідношення вимірювань та очікуваних значень на 100 (очікуване значення = (ендогенний Т3 + доданий Т3) / 2; через розведення сироватки 1: 2 із насиченим матеріалом).

	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3
Концентрація (нг/мл)	1.09	1.38	2.37
Середнє відновлення (%)	102.5	103.0	105.3
Діапазон відновлення (%)	Від	99.8	88.4
	До	106.9	109.2
		108.7	108.7

9.6 Лінійність

	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3
Концентрація (нг/мл)	3.70	3.90	3.36
Середнє відновлення (%)	104.8	100.1	100.1
Діапазон відновлення (%)	Від	100.0	94.9
	До	111.0	106.8
		107.3	107.3

10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу буде виконана відповідно до інструкції, що міститься в упаковці, та з дотриманням належної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

10.1 Інтерферуючі препарати

Таблиця препаратів, що заважають лікуванню, та станів, що впливають на загальні значення трийодтироніну, складена в Журналі Американської асоціації клінічних хіміків (3).

10.2 «Хук-ефект» високої дози

У даному тесті не спостерігався «хук-ефект».

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в рамках процедури випробування достатню кількість контролів для оцінки правильності та точності тесту.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролі знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури. У випадку будь-яких сумнівів або занепокоєння зверніться до DRG.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки, якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



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.drg-diagnostics.de
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drg@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

