

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ТРИЙОДТИРОНІН ВІЛЬНИЙ (ТЗ ВІЛЬНИЙ) ELISA

Free FT-3 ELISA

Кат. №: EIA-2385

Дата випуску інструкції: 09-2022

Кількість тестів: 96

Версія: 15.0



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

Використовувати тільки для *in vitro* діагностики

Зберігати при температурі від 2 °C (°C) до 8 °C (°C).

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Для кількісного визначення концентрації Вільного Трийодтироніну (fT3) в сироватці людини.

1.1 Вступ

L-Трийодтиронін, тиреоїдний гормон, циркулює в крові, в основному пов'язаним з білком-носієм (>99.5%). Основним білком-носієм є тироксин-зв'язуючий глобулін (TBG). Однак, тільки вільна (незв'язана) частина Трийодтироніну відповідає за біологічну активність. Більше того, концентрація білка-носія зростає при різних клінічних умовах, наприклад, при вагітності. У індивідів з нормальною тиреоїдною функцією, при зміні концентрації білків-носіїв змінюються рівні загального ТЗ, тоді як концентрація вільного Трийодтироніну (ТЗ) залишається незмінною. Тому, вимірювання концентрації вільного ТЗ корелює надійніше з клінічним статусом, ніж рівні загального Трийодтироніну.

Наприклад, зростання рівнів загального Трийодтироніну пов'язано з вагітністю, прийомом контрацептивів і естрогенною терапією, призводить до вищих рівнів загального ТЗ, тоді як концентрація вільного ТЗ залишається практично незмінною.

Даний мікропланшетний ферментний імуноаналіз забезпечує оптимальну чутливість, при цьому вимагаючи нескладних маніпуляцій для прямого визначення вільного ТЗ.

2 ПРИНЦИП ТЕСТУ

Аналіз fT3 є конкурентним імуноферментним аналізом твердої фази. Зразки сироватки пацієнта, стандарти та робочий реагент кон'юганту ТЗ-фермент додаються в лунки мікропланшета, покриті моноклональним антитілом ТЗ. fT3 у зразку пацієнта і кон'югат, мічений ТЗ, конкурують за доступні сайти зв'язування на антитілах. Після 60-хвилинної інкубації при кімнатній температурі, лунки промиваються водою для видалення незв'язаного кон'юганту ТЗ. Потім додається розчин H₂O₂/ТМБ і інкубується протягом 20 хвилин, в результаті чого відбувається розвиток блакитного забарвлення. Розвиток забарвлення зупиняється додаванням 3N HCl і абсорбція вимірюється спектрофотометрично при 450 нм (nm). Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості присутнього ферменту і обернено пропорційна кількості неміченого fT3 в зразку. Концентрація fT3 в невідомих зразках кількісно визначається відповідно до серії стандартів fT3, які аналізуються таким же способом.

3 РЕАГЕНТИ

3.1 Матеріали, які постачаються з набором

- **Мікропланшет з нанесеними антитілами** (1 планшет, 96 лунок)
Мікротитраційні лунки, покриті Анти-ТЗ
- Реагент **Кон'югату fT3-фермент**, готовий до використання (1 флакон, 10.5 мл (ml))
Містить антитіла ТЗ, кон'юговані з пероксидазою хрому, та консерванти
- Референсний **Стандарт** Вільного ТЗ, набір (1.0 мл (ml)/флакон)
Містить 0-0.9-2.2-5.0-9.0-19.0 пг/мл (pg/ml) вільного ТЗ у сироватці людини із консервантами; рідкий, готовий до використання
**Точні концентрації зазначені на етикетках, відповідно до лоту.*
- **Кольоровий реагент А**, (1 пляшка, 13 мл (ml))
Містить перекис водню в ацетатному буфері

- **Кольоровий реагент В**, (1 пляшка, 13 мл (ml))
Містить 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ), стабілізований у буферному розчині.
- **Стоп-розчин**, (3N HCl) (1 пляшка, 10 мл (ml))
Містить розведену соляну кислоту

3.2 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором:

- Дозатор зі здатністю внесення об'ємів 50 мкл (μl) з точністю вище, ніж 1.5%.
- Диспенсер(и) для повторного внесення об'ємів 0.050 мл (ml) і 0.200 мл (ml) з точністю вище, ніж 1.5%.
- Зчитувач мікропланшетів із здатністю абсорбції на довжині хвилі 450 нм (nm).
- Тестові пробірки для розведення ферментного кон'юганту і для змішування Кольорового Реагенту А і Кольорового Реагенту В.
- Абсорбуючий папір для висушування лунок мікропланшета.
- Таймер.
- Матеріали контролю якості.

4 ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

Сироватку отримують зі зразків цільної крові, отриманих з відповідними техніками забору.

Набір призначений для роботи тільки зі зразками сироватки без додатків. Зразки сироватки можуть зберігатися в холодильнику при 2-8 °C (°C) максимум 48 годин. Якщо зразки не будуть проаналізовані протягом 48 годин, вони можуть зберігатися при температурі -20 °C (°C) до 30 днів.

5 ЗБЕРІГАННЯ НАБОРУ ТА ІНСТРУМЕНТАРІЮ

Нерозкриті тест-набори слід зберігати при температурі 2-8 °C (°C) після отримання, а мікропланшет слід зберігати в герметичному пакеті з осушувачами, щоб мінімізувати вплив вологого повітря.

Відкриті тестові набори залишатимуться стабільними до закінчення зазначеного терміну придатності за умови зберігання, як описано вище.

Зчитувач мікропланшетів з пропускнуною здатністю 10 нм (nm) або менше та діапазоном оптичної густини 0-2 OD або більше на довжині хвилі 450 нм (nm) прийнятний для використання для вимірювання абсорбції.

6 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТУ

Розчин Робочого Субстрату - приготуйте безпосередньо перед використанням.

Для приготування розчину H₂O₂/ТМБ приготуйте змішування 1:1 Кольорового Реагенту А і Кольорового Реагенту В за 1 годину до використання. Обережно перемішайте, щоб забезпечити повне змішування.

Підготовлений розчин реагенту H₂O₂/ТМБ повинен бути готовий за 15 хвилин до використання і є стабільним при кімнатній температурі в темряві до 3 годин. Необхідно утилізувати залишок після використання.

7 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перш ніж приступити до аналізу, нагрійте всі реагенти, референсні сироватки та контролю до кімнатної температури (18-25 °C (°C)).

1. Підготуйте лунки мікропланшета для кожної референсної сироватки, контролю і зразка пацієнта для аналізу в дублях.
2. Внесіть по 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) відповідної референсної сироватки, контролю і зразка у відповідні лунки.
3. Внесіть 0.100 мл (ml) (100 мкл (μl)) реагенту кон'юганту ТЗ-фермент в усі лунки.
4. Обережно покрутіть мікропланшет протягом 20-30 секунд, щоб перемішати та накрийте його.
5. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 60 хвилин.
6. Видаліть інкубаційну суміш, видаливши вміст планшета в контейнер для відходів. Промийте та спорожніть мікропланшет 5 разів деіонізованою водою. Різко стукніть мікропланшетом об абсорбуючий папір або паперові рушники, щоб видалити всі залишкові краплі води.
7. Додайте по 0.200 мл (ml) (200 мкл (μl)) **Розчину Робочого Субстрату** в кожну лунку (див. розділ Підготовка реагенту). **Завжди додавайте реагенти в тому самому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.** Акуратно перемішайте протягом 10 секунд.
8. Інкубуйте при кімнатній температурі в темряві протягом 20 хвилин.
9. Зупиніть реакцію внесенням 50 мкл (μl) 3N HCl в кожну лунку.
10. Обережно перемішайте протягом 30 секунд. **Дуже важливо, щоб блакитний колір повністю змінився на жовтий.**

11. Зчитайте абсорбцію при 450 нм (nm) за допомогою пристрою для зчитування лунок мікропланшета протягом 30 хвилин.

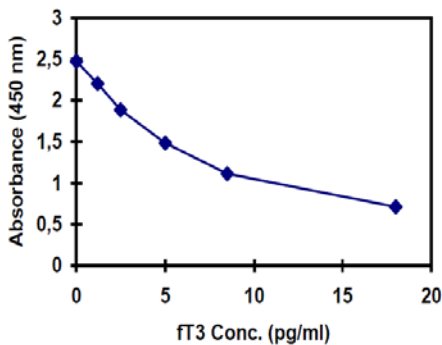
8 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Розрахуйте середні значення абсорбції (A_{450}) для кожного набору референсних стандартів, контролів і зразків пацієнтів.
- Побудуйте стандартну криву, відклавши на міліметровому папері середні значення абсорбції, отримане для кожного референсного стандарту, проти його концентрації в пг/мл (pg/ml), зі значеннями абсорбції на вертикальній осі або осі Y, а концентраціями на горизонтальній осі або осі X.
- Використовуйте середні значення абсорбції для кожного зразка, щоб визначити відповідну концентрацію fT3 у пг/мл (pg/ml) за стандартною кривою.

8.1 Приклад стандартної кривої

Результати типового стандартного циклу зі значеннями оптичної густини при 450 нм (nm) показані на осі Y проти концентрацій fT3, показаних на осі X. Ця стандартна крива призначена лише для ілюстрації та не повинна використовуватися для обчислення невідомих. Кожен користувач повинен отримати власні дані та стандартну криву в кожному аналізі.

fT3 (пг/мл (pg/ml))	Абсорбція (450 нм (nm))
0	2.474
1.2	2.202
2.5	1.884
5.0	1.485
8.5	1.117
18.0	0.710



Absorbance (450 nm) - Абсорбція (450 нм)
fT3 Conc. (pg/ml) - Конц. fT3 (пг/мл)

9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Достовірність

Тест-систему для мікропланшетного визначення fT3 методом ІФА порівнювали з методом радіоімунологічного аналізу в пробірці з покриттям. Були використані біологічні зразки з гіпотиреоїдних, еутиреоїдних і гіпертиреоїдних популяцій (значення коливалися від 0.1 пг/мл (pg/ml) до 14 пг/мл (pg/ml)). Загальна кількість таких зразків складала 151.

Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для цієї Тест-системи fT3 ІФА у порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в наступній таблиці:

Метод	Середнє (X)	Аналіз найменшої квадратної регресії	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	3.045	$y = 0.978(x) - 0.116$	0.950
Референсний	2.921		

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 методу.

9.2 Точність

Точність тестування в аналізі та між аналізами Тест-системи для мікропланшетного визначення fT3 методом ІФА визначали за допомогою аналізів трьох різних рівнів пулу контрольних сироваток. Кількість, середні значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток наведено в наступних таблицях:

Точність в аналізі (Значення у пг/мл (pg/ml))

Зразок	N	X	S.D.	C.V.%
Низький	24	1.85	0.09	4.9
Нормальний	24	4.49	0.16	3.6
Високий	24	8.0	0.25	3.1

Точність між аналізами (значення у пг/мл (pg/ml))*

Зразок	N	X	S.D.	C.V.%
Низький	12	2.16	0.29	13.1
Нормальний	12	5.09	0.40	7.9
Високий	12	9.13	0.94	10.2

*Всі вимірювання проводилися в 10 експериментах в дублях протягом 10 днів.

9.3 Специфічність

Перехресну реактивність антитіл до трийодтироніну з вибраними речовинами оцінювали шляхом додавання інтерферуючої речовини до матриці сироватки в різних концентраціях. Перехресну реактивність розраховували шляхом виведення співвідношення між дозою речовини, що інтерферує, і дозою трийодтироніну, необхідної для витіснення такої ж кількості трейсера.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
I-Трийодтиронін	1.0000	-
I-Тироксин	< 0.0002	10 мкг/мл (µg/ml)
Йодотирозин	< 0.0001	10 мкг/мл (µg/ml)
Дийодотирозин	< 0.0001	10 мкг/мл (µg/ml)
Фенилбутзон	< 0.0001	10 мкг/мл (µg/ml)
Саліцилат натрію	< 0.0001	10 мкг/мл (µg/ml)

9.4 Чутливість

Чутливість набору становить 0.05 пг/мл (pg/ml). Чутливість була встановлена шляхом визначення варіабельності калібратора сироватки 0 пг/мл (pg/ml) і використання статистики 2σ (95% вірогідності) для розрахунку мінімальної дози.

10 ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Було проведено дослідження еутиреоїдного дорослого населення, щоб визначити очікувані значення для Тест-системи fT3 ІФА. Середні значення (X), стандартні відхилення (σ) та очікувані діапазони ($\pm 2\sigma$) представлені в наступній таблиці:

Очікувані значення для Тест-системи fT3 ІФА (у пг/мл (pg/ml))

	Дорослі (110 зразків)	Вагітні (75 зразків)
Середнє значення (X)	2.8	3.0
Стандартне відхилення (σ)	0.7	0.6
Очікувані діапазони ($\pm 2\sigma$)	1.4- 4.2	1.8-4.2

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які, як очікується, буде знайдено за допомогою даного методу для популяції «нормальних» людей, залежить від кількох факторів: специфічності методу, популяції, що тестується, 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.

11 КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Зміни в концентрації зв'язуючих білків у сироватці зазвичай призводять до відповідної зміни концентрації загального Т3, тоді як рівень фізіологічно активного вільного Т3 залишається в основному незмінним у еутиреоїдній людини. Таким чином, визначення концентрації вільного Т3 може забезпечити більш точну оцінку стану щитовидної залози, ніж вимірювання загального Т3. Підвищені концентрації вільного Т3 вказують на гіпертиреоз, а низькі рівні вказують на гіпотиреоз.

12 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Надійні та відтворювані результати будуть отримані, якщо процедура аналізу виконується з повним розумінням інструкцій і з дотриманням належної лабораторної практики.

2. Процедура промивання є критичною. Недостатнє промивання призведе до низької точності та хибно підвищених показників абсорбції.
3. Зразки сироватки, які демонструють значну ліпемію, значний гемоліз або помутніння, не слід використовувати з цим тестом.
4. Тільки для професійного використання. Результати, отримані в результаті використання цього набору, слід використовувати лише як доповнення до інших діагностичних процедур та інформації, доступної лікарю.
5. Якщо набір не працює, скористайтеся альтернативною процедурою діагностики або зверніться до виробника.



ВИРОБНИК

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



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014, Україна
тел.: +38 (067) 343-67-64
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

