

Інструкція з використання вільний ТЗ ІФА

2 покоління

TF E-2100

IVD



Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

Версія 6.0 2019-02-05

Використання за призначенням

Для прямого кількісного визначення вільного трийодтироніну методом імуноферментного аналізу в сироватці людини. Тільки для *in vitro* діагностики.

ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Принцип наступного імуноферментного аналізу наслідує типовий конкурентний сценарій зв'язування. Конкуренція відбувається між неміченим антигеном (присутній у стандартах, контролях та зразках пацієнтів) і міченим ферментом антигеном(кон'югат) для обмеженої кількості сайтів зв'язування антитіл на мікропланшеті.

Процедури промивання та декантації видаляють незв'язані матеріали. Після етапу промивання субстрат ферменту додається. Ферментативну реакцію припиняють додаванням стоп-розчину. Вимірюють поглинання на рідері мікротитрувального планшета. Інтенсивність сформованого кольору обернено пропорційна концентрації вільного Т3 у зразку. Набір стандартів використовується для побудови стандартної кривої, з якої кількість вільного Т3 в зразках пацієнта і контролях може бути безпосередньо зчитана.

Мічений Т3 (кон'югат), використовуваний у цій системі аналізу, не виявив зв'язуючих властивостей щодо зв'язування з тироксин - зв'язуючим глобуліном (TBG) і людським сироватковим альбуміном (HSA). Сайти зв'язування на мікропланшетах призначені для того, щоб мати низьку зв'язуючу здатність, щоб не порушувати рівновагу між Т3 і його несучими білками. Випробування проводять при нормальних фізіологічних умовах рН, температури і йонній сили.

КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Трийодтиронін (Т3) - це тиреоїдний гормон, що циркулює в крові. Т3 містить три атоми йоду і виробляється в основному за допомогою екстратиреоїдної конверсії тироксину (Т4), головного гормону щитовидної залози з чотирма атомами йоду. Більша частина Т3, що циркулює в крові, пов'язана з білками-носіями, такими як ТЗГ (TBG), преальбумін і альбумін. Вільна фракція Т3 (fT3), яка становить лише 0,25% від загальної кількості, вважається фізіологічно активною фракцією.

Загальні рівні Т3 залежать не тільки від стану щитоподібної залози і периферичної конверсії Т4 до Т3, але і від концентрації тиреоїдних зв'язуючих білків. З іншого боку, вільний Т3 (fT3) значною мірою не впливає на варіації в цих білках-носіях, які можуть відбуватися в таких умовах, як вагітність, естрогенна терапія та використання оральних контрацептивів. Таким чином, вільний Т3 більш надійно відображає фактичний стан щитовидної залози пацієнта ніж загальний Т3.

Вимірювання вільного Т3, як правило, рекомендується пацієнтам з симптомами гіпертиреозу, які знайдено при Хворобі Грейвса, токсичній аденомі і токсичному мультинодулярному зобі.

ПРОЦЕДУРНІ ПОПЕРЕДЖЕННЯ І ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Користувачі повинні мати глибоке розуміння цього протоколу для успішного використання цього набору. Надійний прогін забезпечується при виконанні інструкцій.
2. Контролі або сироваткові басейни повинні бути включені в кожен пробіг на високому і низькому рівнях для оцінки достовірності результатів.
3. При використанні води для розведення або відновлення використовуйте дейонізовану або дистильовану воду.
4. Щоб зменшити вплив потенційно шкідливих речовин, слід носити рукавички під час обробки набору реактивів і людських зразків.
5. Всі реагенти і зразки набору повинні бути приведені до кімнатної температури і обережно, але ретельно змішані перед використанням. Уникайте повторного заморожування та відтавання реагентів та зразків.
6. Стандартна крива повинна бути встановлена для кожного циклу.

7. Контроль повинен бути включений до кожного циклу і повинен підпадати під встановлені межі довіри.
8. Неналежа технологічна методика, неточне піпетування, неповне промивання, а також неправильне зберігання реагенту може бути вказано, коли значення аналізу для контролів не відображають встановлені діапазони.
9. При зчитуванні мікропланшетів наявність бульбашок у лунках впливає на оптичну густину (ОГ). Перед виконанням етапу зчитування обережно видаліть будь-які бульбашки.
10. Розчин субстрату (ТМБ) чутливий до світла і при належному зберіганні повинен залишатися безбарвним. Розвиток синього кольору може вказувати на нестабільність або забруднення, в цьому випадку набір не повинен використовуватися.
11. При дозуванні субстрату та стоп - розчину не використовуйте піпетки, в яких потраплять ці рідини в контакт з будь-якими металевими деталями.
12. Щоб запобігти забрудненню реагентів, використовуйте новий наконечник для одноразової піпетки для видачі кожного реагенту, зразку, стандарту і контролю.
13. Не змішуйте різноманітні номери комплекту компонентів у тесті і не використовуйте жодних компонентів за межами терміну придатності, нанесеному на етикетці.
14. Реагенти набору повинні розглядатися як небезпечні відходи і утилізуватися відповідно до національних правил.

ОБМЕЖЕННЯ

1. Всі реагенти всередині набору калібруються для безпосереднього визначення вільного ТЗ в сироватці людини. Комплект не є відкалібрований для визначення вільного ТЗ в інших зразках людського або тваринного походження.
2. Не використовуйте сильно гемолізовану, сильно ліпемічну, жовтяничну або неправильно збережену сироватку.
3. Будь-які зразки або контрольні сироватки, що містять азид або тимеросал, не сумісні з цим набором, тому що можливо призводять до помилкових результатів.
4. Читання зразків, що перевищують 40 пг / мл, слід повідомляти як таке, яке не слід розбавляти. Розбавлення буде змінювати існуючу рівновагу і призводити до помилкових результатів.
5. Інтерпретація результатів вільного ТЗ може ускладнюватися різноманітними лікарськими засобами, тяжким тиреоїдним захворюванням і деякими рідкісними умовами, такими як сімейна дисальбумінемічна гіпертироксинемія (ФДГ). Для діагностики результати цього аналізу завжди слід використовувати в поєднанні з клінічним обстеженням, історією хвороби та іншими висновками.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

ПОТЕНЦІЙНИЙ БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНИЙ МАТЕРІАЛ

Сироватка людини, яка може бути використана при підготовці стандартів і контролів, була випробувана і встановлена нереактивною для поверхневого антигену гепатиту В і також була протестована на наявність антитіл до HCV і вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) і виявилася негативною. Однак жоден метод тестування не може запропонувати повну впевненість, що ВІЛ, вірус гепатиту С і вірус гепатиту В або будь-які інфекційні агенти відсутні. Реагенти слід розглядати як потенційну біологічну небезпеку і обробляти з тими ж заходами, які застосовуються до будь-якого зразка крові.

ХІМІЧНА НЕБЕЗПЕКА

Уникайте контакту з реагентами, що містять ТМБ, перекис водню та сірчану кислоту. Якщо контактували з будь-яким з них реагентів, промити великою кількістю води. ТМБ є підозрюваним канцерогеном.

ЗАБІР І ЗБЕРЕЖЕННЯ ЗРАЗКУ

Приблизно 0,1 мл сироватки потрібно для кожного визначення в дублікатах. Зберіть 4–5 мл крові в відповідним чином позначені пробірки і дозволити їй згорнутися. Центрифугують і обережно видаляють сироватковий шар. Зберігати при 4 ° С до 24 годин або при -10 ° С або нижче, якщо аналіз проводиться пізніше. Розглядати всі людські зразки як можливі біологічно небезпечні матеріали і вживати відповідних заходів обережності.

ПОПЕРЕДНЯ ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Цей аналіз є прямою системою; не потрібно попередньої обробки зразків.

РЕАГЕНТИ ТА ОБЛАДНАННЯ НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ

1. Точні піпетки для дозування 25, 100, 150 і 300 мкл
2. Одноразові наконечники для піпеток
3. Дистильована або дейонізована вода
4. Інкубатор 37 оС
5. Рідер для зчитування мікропланшетів з фільтром, встановленим на 450 нм, і верхньою межею ОГ 3,0 або вище *(див. етап 11 процедури аналізу).

РЕАГЕНТИ НАДАНІ

1. AA E-0030 Концентрат буфера для промивання - вимагає приготування X10

Зміст: Один флакон, що містить буфер з неіонним детергентом і консервант, який не містить ртуті.

Об'єм: 50 мл / флакон

Зберігання: Охолодженням при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Приготування: Розбавте 1:10 у дистильованій або дейонізованій воді перед використанням. Якщо використовується вся пластина, розбавляйте 50 мл промивного буфера концентрату в 450 мл води.

2. AA E-0055 ТМБ субстрат - готовий до використання.

Зміст: Одна пляшка, що містить тетраметилбензидин і перекис водню в буфері, який не містить DMF або DMSO

Об'єм: 16 мл / флакон

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

3. AA E-0080 Стоп розчин - Готовий до використання.

Зміст: Один флакон, що містить 1М сірчану кислоту.

Об'єм: 6 мл / флакон

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Небезпеки



ідентифікація:

H290 Може бути корозійним для металів.

H314 Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей.

4. Стандарти та контролі - готові до використання.

Нижче наведені приблизні концентрації, будь ласка, зверніться до етикеток флаконів для точних концентрацій

Каталожний номер	позначення	стандарт	концентрація	Обсяг/флакон
TF E 2101	STANDART A	Стандарт А	0 пг/мл	0,5 мл
TF E 2102	STANDART B	Стандарт В	2 пг/мл	0,5 мл
TF E 2103	STANDART C	Стандарт С	4 пг/мл	0,5 мл
TF E 2104	STANDART D	Стандарт D	8 пг/мл	0,5 мл
TF E 2105	STANDART E	Стандарт Е	16 пг/мл	0,5 мл
TF E 2106	STANDART F	Стандарт F	40 пг/мл	
TF E 2151	CONTROL 1	Контроль 1	Дивіться етикетки флакона для очікуваних значень і прийнятного діапазону !	0,5 мл
TF E 2152	CONTROL 2	Контроль 2		0,5 мл

Зміст: вільний Т3 в матриці на основі сироватки людини з консервантом, що не містить ртуті. Готують збагаченням сироватки з певною кількістю Т3.

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців у закритих флаконах або як зазначено на етикетці. Після відкриття стандарти повинні бути використані протягом 14 днів або аліквотовані і зберігатися в замороженому вигляді. Уникайте циклів багаторазового заморожування та відтавання

5. TF E-2113 Буфер аналізу - готовий до використання.

Зміст: Один флакон, що містить буфер на основі білка з консервантом, що не містить ртуті.

Об'єм: 15 мл / флакон

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

6. TF E-2131 Кролячий анти-вільний Т3 антитілами покритий розбірний мікропланшет - готовий до використання.

Зміст: Один 96-лунковий (12x8) мікропланшет, покритий поліклональним антитілом, в герметично закритому пакеті з осушувачем.

Зберігання: Охолодженням при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

7. TF E-2140 вільний Т4 - Концентрат кон'югату пероксидази з хрону (HRP) - вимагає

Підготовку X50

Зміст: кон'югат вільний Т3-HRP в буфері на основі білка з не ртутним консервантом .

Об'єм: 300 мкл / флакон

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Приготування: Розбавте 1:50 в буфері для аналізу перед використанням (наприклад, 40 мкл HRP в 2 мл буфера для аналізу). Якщо в цілому планшет, який слід використовувати, розбавляють 240 мкл HRP в 12 мл буфера для аналізу. Видаліть все, що залишилося.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Попередня обробка зразків: **Немає.**

Всі реактиви повинні досягати кімнатної температури перед використанням. Стандарти, контролю та зразки повинні бути проаналізовані в двох примірниках. Після початку процедури всі кроки повинні бути завершені без перерви.

1. Готують робочі розчини кон'югату вільного ТЗ-HRP і промивного буфера.
2. Відокремте необхідну кількість смуг. Закрийте пакет і поверніть невикористані смужки в холодильник.
3. Внесіть 25 мкл кожного стандарту, контролю і зразку у відповідні мічені лунки в дублікатах.
4. Внесіть 100 мкл робочого розчину кон'югату в кожну лунку.
(Ми рекомендуємо використовувати багатоканальну піпетку.)
5. Обережно струсніть планшет протягом 10 секунд.
6. Інкубуйте планшет при 37°C протягом 1 години.
7. Промити лунки 3 рази по 300 мкл розведеного промивного буфера на лунку і міцно натиснути на поглинаючий папір, щоб переконаватися, що вона суха.
(Рекомендується використання вошера).
8. Прокапайте по 150 мкл субстрату ТМБ у кожну лунку на певні проміжки часу.
9. Інкубуйте планшет при 37°C протягом 10-15 хвилин
(або доки стандарт А не досягне темно-синього кольору для бажаної ОГ).
10. Прокапайте по 50 мкл стоп - розчину, у кожну лунку з такими ж часовими інтервалами, як у кроці 8.
11. Зчитують планшет на рідері мікропланшетів при 450 нм протягом 20 хвилин після додавання стоп-розчину. Якщо ОГ перевищує верхню межу виявлення або якщо фільтр 450 нм недоступний, на фільтр 405 або 415 нм можна замінити. Оптична густина буде нижчою, однак це не вплине на результати зразків пацієнта / контроль.

РОЗРАХУНОК

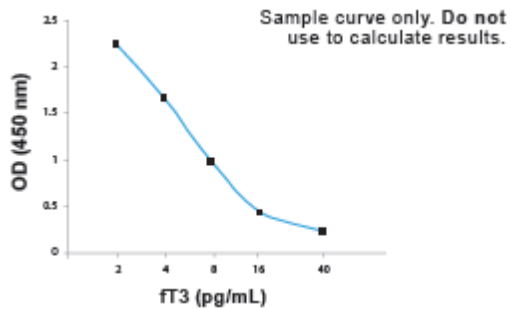
1. Розрахувати середню оптичну густину кожного дублікату стандарту.
2. Намалюйте стандартну криву на напівлогарифмічному папері з середньою оптичною густиною по осі Y і концентрацією стандарту на осі X. Якщо використовується програмне забезпечення імунологічного аналізу, крива 4-параметрів або 5 параметрів рекомендується.
3. Розрахувати середню оптичну густину кожного невідомого дублікату.
4. Зчитуйте значення невідомих безпосередньо від стандартної кривої.

ТИПОВІ ТАБЛИЧНІ ДАНІ

Тільки зразкові дані. Не використовуйте для розрахунку результатів.

стандарт	ОГ1	ОГ2	Значення ОГ	Обсяг (пг/мл)
A	2,798	2.734	2.764	0
B	2,284	2.216	2.250	2
C	1,697	1.638	1.668	4
D	1,002	0.956	0.979	8
E	0,452	0.437	0.444	16
F	0.247	0.238	0.242	40
невідомий	1.460	1.439	1.450	4.8

Типова стандартна крива



ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

Чутливість

Нижня межа виявлення розраховується з стандартної кривої шляхом визначення отриманої концентрації середньої ОГ стандарту А (на основі 10 повторних аналізів) мінус 2 СВ. Тому чутливість Прямий набір вільного Т3 ІФА становить 0.3 пг / мл.

СПЕЦИФІЧНІСТЬ (Перехресна реактивність)

Наступні з'єднання тестували на перехресну реактивність з набором ІФА прямий вільний Т3 з перехресною реакцією Т3 при 100%.

з'єднання	% перехресної реактивності
L-трийодтиронін	100
D-трийодтиронін	34
Трийодтитропропіонова кислота	20
Двойодистий Д - тиронін	0,5
D - тироксин	0,3
L - тироксин	0,9

Наступні сполуки тестували, але перехресно реагували менш ніж 0,1%: Дійодтирозин, йодотирозин, Фенітоїн, саліцилат натрію і r-трийодтиронін.

ТОЧНІСТЬ ВНУТРІШНЬОАНАЛІТИЧНА

Три зразка аналізували десять разів на одній стандартній кривій. Результати (в пг / мл) наведені в таблиці нижче

зразок	середнє	СВ	CV %
1	5,182	0,501	9,7%
2	8,560	0,598	7,0%
3	48,200	1,686	3,5%

Точність між аналізами

Три зразка аналізували десять разів протягом чотирьох тижнів. Результати (в пг / мл) наведені в таблиці нижче

зразок	середнє	СВ	CV %
1	2,306	0,284	8,6
2	5,154	0,402	7,8
3	8,698	0,713	8,2

ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Що стосується всіх клінічних досліджень, кожна лабораторія повинна збирати дані та встановлювати власний діапазон очікуваних нормальних значень. Наступний референтний діапазон (пг / мл) був встановлений у 44 очевидно здорових дорослих

група	кількість	середнє	Центральний 95% Діапазон
еутиреоїдні дорослі	44	3,7	2,2-5,3

ВПЛИВ ТИРОКСИН - зв'язуючого ГЛОБУЛІНУ (TBG)

Метою даного дослідження було вивчення можливих перешкод, викликаних зв'язуванням TBG з вільним Т3-Кон'югат HRP. Стандарт А збагачували очищенням ТБГ і аналізували
Результати наведені нижче:

Тироксин зв'язуючий глобулін (мкг/мл) доданий	ОГ	% В/В0
0	1,255	100
12,5	1,229	98
25	1,170	93
50	1,137	91
100	1,168	93
200	1,174	94
400	1,118	89

Результати показують відсутність зв'язування міченого Т3 з ТЗГ навіть при більш високих, ніж нормальні рівні. На закінчення, результати показали, що не було значного впливу TBG в Прямому Вільному Т3 наборі ІФА.

ВПЛИВ АЛЬБУМІНУ СИРОВАТКИ ЛЮДИНИ (HSA)

Метою даного дослідження було дослідити можливе втручання HSA в процедуру аналізу. Стандарт А обробляли очищенням HSA і аналізували.

Результати наведені нижче:

HSA (мг/мл доданий)	ОГ	% В/В0
0	1,255	100
3,125	1,228	98
6,25	1,331	100
12,5	1,245	99
25	1,197	95
50	1,217	97
100	1,063	85

Результати не показують значного зв'язування міченого Т3 з HSA навіть при більш високих, ніж нормальні рівні.

ВПЛИВ НЕЕТЕРИФІКОВАНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ

Метою цього дослідження було вивчення можливого втручання неетерифікованих жирних кислот в процедуру аналізу. Два зразки були збагачені олеїновою кислотою і проаналізовані.

Результати наведені нижче:

Неетерифіковані жирні кислоти (ммоль/ л додані)	Зразок 1 (пг/мл)	Зразок 2 (пг/мл)
0	4,4	8,7
0,5	4,6	7,5
3,5	4,6	8,3
25	4,6	10,9

Результати показують, що неетерифіковані жирні кислоти можуть збільшувати вільні значення ТЗ тільки при більш високих, ніж нормальні концентрації.

ВПЛИВ ЛІПЕМІЇ

Метою даного дослідження було вивчення можливого впливу ліпемічних зразків на процедуру аналізу. Два зразка були збагачені тригліцеридами і проаналізовані.

Результати наведені нижче:

Тригліцериди (мг/дл) додані	Зразок1 (пг/мл)	Зразок 2 (пг/мл)
0	4,4	8,7
50	5,5	9,9
75	5,9	10,8

Результати показують, що ліпемічні зразки можуть збільшувати вільні значення ТЗ. Тому ліпемічні зразки не повинні бути використано в цьому аналізі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Mullinger RN, et al. Free Triiodothyronine in Nonthyroidal Illness. Clin Chem. 1993; 39(7):1555.
2. Wilkins TA, et al. Assay Performance and Tracer Properties for Two Analog-based of Free Triiodothyronine. Clin Chem. 1986; 32(3):465–9.
3. Ekins R. Measurement of Free Hormones in Blood. Endocr Rev. 1990; 11(1):5–46.
4. John R, et al. Concentration of Free Thyroxine and Free Triiodothyronine in Serum with Patients with Thyroxine and Triiodothyronine Binding Autoantibodies. Clin Chem. 1990; 36(3):470–3.
5. Chopra IJ. RIA of iodothyronines. In: Abraham GE ed. Handbook of radioimmunoassay. New York: Marcel Dekker Inc; 1997:679.
6. Demers LM. Thyroid function testing and automation. J Clin Ligand Assay. 1999; 22:38.
7. Kalra J, Hart IR. Value of Free Thyroxine (FT4), Free Tri-iodothyronine (FT3) and Sensitive Thyrotropin (TSH) Assay in the Assessment of Optimal Thyroxine Therapy. Clin Biochem. 1987; 20(4):265–7.
8. Bergmann PJ, Van Tricht L. Free Triiodothyronine in Hypo-thyroidism and Nonthyroidal Illness. Clin Chem. 1994; 40(3):496–7.
9. Cohen JH, et al. Thyrotoxicosis Due to Ingestion of Excess Thyroid Hormone. Endocr Rev. 1993; 10(2):113–24.
10. Ingbar SH, et al. A New Method for Measuring the Free Thyroid Hormone in Human Serum and an Analysis of the Factors That Interference its Concentration. J Clin Invest. 1965; 44(10):1679–89.
11. Pedersen KO. Simultaneous Determination of the Free Thyroxine and Triiodothyronine Fractions in Serum. Scand J Clin Lab Invest. 1974; 34(3):241–6.
12. Weeke J, Orskov H. Ultrasensitive Radioimmunoassay for Direct Determination of Free Triiodothyronine Concentration in Human Serum. Scand J Clin Lab Invest. 1975; 35(3):237.
13. Oddie TH et al. Triiodothyronine Turnover in Euthyroid Subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1971; 33:653.
14. Nauman JA, et al. Total and Free Triiodothyronine in Human Serum. J Clin Invest. 1967; 46(8):1346–55.

Умовні позначення :

 Температура зберігання	 Виробник	 Містить достатньо <N> випробувань
 Дата закінчення терміну придатності	LOT Код партії	IVD Тільки ін вітро для діагностики в лабораторних умовах!
 Зверніться до інструкції з використання	CONT Зміст	CE Маркування
Небезпека	REF Каталожний номер	RUO тільки для дослідницьких цілей