

# НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТИРОКСИНУ Т4, ВИСОКОЧУТЛИВИЙ

## T4 High Sensitivity ELISA Kit

Кат. №: 12825-300A

Дата випуску інструкції: 01-08-2020

Версія 0



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

### 1.0 ВВЕДЕННЯ

Застосування за призначенням: Кількісне визначення концентрації загального Тироксину в сироватці крові за допомогою імуноферментного аналізу мікропланшетів.

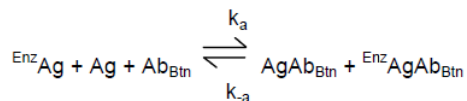
### 2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Конкурентний імуноферментний аналіз - Тип 7

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіла, похідні ферменту-антигену, нативний антиген та субстрат, що виробляє колір.

При змішуванні біотинильованого антитіла, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, виникає реакція конкуренції між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген для обмеженої кількості сайтів зв'язування антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{\text{Btn}}$  = Anti-T4-IgG мічене біотином (постійна кількість)

$\text{Ag}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{Enz}^{\text{Ag}}$  = Кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

$\text{AgAb}_{\text{Btn}}$  = Комплекс антиген-антитіло

$\text{Enz}^{\text{Ag}}\text{Ab}_{\text{Btn}}$  = Кон'югат фермент-антиген-Комплекс антитіл

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = константа швидкості дисоціації

$K = k_a/k_{-a}$  = Постійна рівноваги

Виникає одночасна реакція між біотином, прикріпленим до антитіла, та стрептавідином, іммобілізованим у мікролуночці. Це впливає на поділ фракції, пов'язаної з антитілами, після декантації або аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{Enz}^{\text{Ag}}\text{Ab}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$  - іммобілізований комплекс

Стрептавідин<sub>CW</sub> = Стрептавідин, іммобілізований в луночці

Іммобілізований комплекс = сендвіч-комплекс, прив'язаний до твердої поверхні

Активність ферменту у фракції, зв'язаній з антитілами, виміряна реакцією із субстратом, обернено пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи кілька різних еталонів сироватки відомих концентрацій антигену, можна сформувати криву реакції на дозу, з якої можна встановити концентрацію антигену невідомого.

### 4.0 РЕАГЕНТИ

#### A. Калібратори Т4 високої чутливості - 0.5 мл/флакон

Сім (7) флаконів з референсною сироваткою для тироксину в концентраціях 0 (A), 0.5 (B), 2.0 (C), 5.0 (D), 10.0 (E), 20.0 (F) та 50.0 нг/мл (G). Зберігати при температурі 2-8 °С. Додано консервант. Для одиниць SI: нг/мл x 1.29 = нмоль/л.

#### B. Високочутливий фермент Т4 - 1.0 мл/флакон

Один (1) флакон містить кон'югат тироксин-пероксидази хрому (HRP) у стабілізуючому матриксі бичачого альбуміну. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

#### C. Буфер кон'югату Т4 - 11 мл/флакон

Один (1) флакон містить буфер, барвник, консервант та інгібітори зв'язуючого білка. Зберігати при температурі 2-8 °С.

#### D. Біотинний реагент Високочутливого Т4 - 6 мл/флакон

Один (1) флакон містить моноклональний IgG віви анти-тироксину у стабілізуючому альбуміновому матриксі людини. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

#### E. Пластина, покрита стрептавідином - 96 лунок

Одна мікропластина із 96 лунками, покрита стрептавідином, упакована в алюмінієвий пакет із сушільним агентом. Зберігати при температурі 2-8 °С.

#### F. Концентрат Промивного розчину - 20 мл/флакон

Один (1) флакон містить ПАР у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

#### G. Субстратний розчин - 12 мл/флакон

Один (1) флакон містить у буфері тетраметилбензидин (ТМВ) та пероксид водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Зберігати при температурі 2-8 °С.

#### H. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

Один (1) флакон містить сильну кислоту (0.5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Зберігати при температурі 2-8 °С.

#### I. Інструкція.

**Примітка 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності набору.

**Примітка 2:** Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °С.

**Примітка 3:** Вищевказані компоненти призначені для одного 96-лунокового мікропланшета.

### 4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Піпетка здатна подавати обсяги 0.15 мл (15 мкл) та 0.050 мл (50 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Дозатор (и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (100 мкл) та 0.350 мл (350 мкл) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Дозатор (-и) регульованого об'єму (20-200 мкл) і (200-1000 мкл) для розведення кон'югату та субстрату.
4. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
6. Пробірки для розведення ферментного кон'югату.
7. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
8. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
9. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
10. Таймер.
11. Контрольні матеріали.

### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in vitro  
Не для внутрішнього або зовнішнього використання  
на людях або тваринах**

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

### 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зібрати зразки за допомогою венепункції у три (3) мл силіконові вакуумні пробірки. Слід дотримуватись звичайних запобіжних заходів при зборі зразків венепункцією. Відокремте еритроцити шляхом центрифугування, використовуйте сироватку або плазму для процедури загального Т4. Зразки можуть зберігатись охолодженими при температурі 2-8 °С протягом максимум 48 годин. Якщо зразок (и) неможливо проаналізувати протягом 48 годин, зразок (зразки) можуть зберігатись при температурі -20 °С протягом 30 днів. Перед аналізом дайте зразкам врівноважитися до температури навколишнього середовища (20 °С - 27 °С). Для аналізу у двох примірниках потрібно 0.030 мл (30 мкл) зразка.

### 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю в гіпотиреоїдному, еутиреоїдному та гіпертиреоїдному діапазоні для моніторингу результатів аналізу. Ці контроли 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. Індивідуальна лабораторія повинна встановити допустимі межі ефективності аналізу. Крім того, максимальна абсорбція повинна відповідати минулому досвіду. Значне відхилення від встановлених показників може свідчити про непомітну зміну

експериментальних умов або погіршення стану реагентів. Свіжі реактиви слід використовувати для визначення причини змін.

## 8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

### 1. Робочий реагент Т4-фермент

Розведіть фермент високої чутливості Т4 1:11 буфером кон'югату Т4 у відповідному контейнері. Наприклад, розведіть 160 мкл ферменту з 1.6 мл буфера для 32 лунок (готується невеликий надлишок розчину). Цей реактив слід використовувати протягом двадцяти чотирьох годин для максимальної ефективності аналізу. Зберігати при температурі 2-8 °С.

Загальна формула:

Кількість необхідного буфера = Кількість лунок/20

Необхідна кількість ферменту Т4 = Кількість лунок/200

тобто =  $16 \div 20 = 0,8$  мл для буфера кон'югату Т4

$16 \div 200 = 0.08$  мл для ферменту високої чутливості Т4

### 2. Альтернативний Біотиновий реагент

Розведіть високочутливий Біотиновий реагент 2: 3 буфером кон'югату Т4 у відповідній ємності. Наприклад, розбавте 1.8 мл біотину з 0.9 мл буфера для 32 лунок (готується невеликий надлишок розчину). Цей реактив слід використовувати протягом двадцяти чотирьох годин для максимальної ефективності аналізу. Зберігати при температурі 2-8 °С. Цей реагент слід використовувати лише для альтернативної схеми процедури у 9.1-Альтернативна процедура.

### 3. Промивний буфер

Розведіть вміст концентрату для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою у відповідній ємності для зберігання. Зберігати розведений буфер при температурі 2-30 °С до 60 днів.

**Примітка 1:** Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактеріальний ріст.

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референсні калібратори і контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °С).

**\*\*Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем\*\***

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °С.
- Внесіть 0.015 мл (15 мкл) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю або зразка у призначену лунку.
- Додайте 0.050 мл (50 мкл) Робочого ферментного реагенту Т4 в кожну лунку (див. Розділ 8.0 Підготовка реагентів).
- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд для перемішування. Можна використовувати шейкер для мікропланшетів. Переконайтесь, що отримано однорідний розчин.
- Додайте 0.05 мл (50 мкл) високочутливого біотинового реагенту в усі лунки.
- Обережно обертайте мікропланшет протягом 20-30 секунд для перемішування. Можна використовувати шейкер для мікропланшетів. Переконайтесь, що отримано однорідний розчин.
- Інкубуйте 90 хвилин при кімнатній температурі в умовах навколишнього середовища **АБО** 60 хвилин при кімнатній температурі, зі швидкістю 150 об/хв на орбітальному мікропланшетному ротаторі.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть пластину насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування 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 гнучка пляшка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) розчину субстрату у всі лунки. Завжди додайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками. Не використовуйте Субстратний розчин, якщо він виглядає блакитним.

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОБАВЛЕННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом двадцяти (20) хвилин.
- Додайте 0.050 мл (50 мкл) стоп-розчину в кожну лунку та обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.

- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

## 9.1 АЛЬТЕРНАТИВНА ПРОЦЕДУРА - ПІДВИЩЕНА ЧУТЛИВІСТЬ

- Приготуйте альтернативний Біотиновий реагент. Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного референсного калібратора сироватки, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки мікропланшета назад в алюмінієвий пакет, закрийте і зберігайте при температурі 2-8 °С.
- Внесіть 0.015 мл (15 мкл) відповідного калібратора сироватки, контролю або зразка у призначену лунку.
- Внесіть 0.075 мл (75 мкл) альтернативного Біотинового реагенту у всі лунки (див. 8.0 Приготування реагенту).
- Накрийте та інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, обертаючи зі швидкістю 150 об/хв на орбітальному мікропланшетному шейкері.
- Зніміть кришку та піпетуйте 0.050 мл (50 мкл) робочого реагенту кон'югату Т4-фермент у всі лунки (див. 8.0 Підготовка реагенту). Не промивайте лунки до цього кроку.
- Накрийте та інкубуйте протягом 45 хвилин при кімнатній температурі, обертаючи зі швидкістю 150 об/хв на орбітальному мікропланшетному шейкері.
- Виконайте кроки 8-10 з 9.0 Протокол аналізу, щоб промити лунки та додати розчин субстрату.
- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом тридцяти (30) хвилин.
- Додайте 0.050 мл (50 мкл) стоп-розчину в кожну лунку та обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд. Завжди додайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.
- Зчитайте поглинання в кожній лунці при 450 нм (використовуючи референсну довжину хвилі 620-630 нм, щоб мінімізувати дефекти в лунці) у пристрої для зчитування мікропланшетів. Результати слід прочитати протягом п'ятнадцяти (15) хвилин після додавання стоп-розчину.

**Примітка:** Для повторного аналізу зразків з концентрацією понад 50 нг/мл в лунку для зразка внесіть піпеткою 0.0075 мл (7.5 мкл) зразка та 0.0075 мл (7.5 мкл) нульової референсної сироватки (це підтримує рівномірну концентрацію білка). Помножте значення зчитування на 2, щоб отримати концентрацію тироксину.

## 10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Тироксину в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Відкладіть значення поглинання для кожного сироваткового референсного калібратора в дублях відповідно до концентрації Т4 в нг/мл на лінійному міліметровому папері (перед тим, як скласти графік, не слід усереднювати дублікати референсного матеріалу сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію Т4 для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у нг/мл) з горизонтальної вісі графіка (дублікати невідомого можуть бути усереднені, як зазначено).

\*Наведені вище дані Прикладу 1 є лише для довідки. Не використовуйте їх для обчислення результатів.

### ПРИКЛАД 1

I.D. зразка	Номер лунки	Abs (A)	Середнє Abs (B)	Значення (нг/мл)
Калібратор А	A1	2.332	2.335	0
	B1	2.338		
Калібратор В	C1	2.148	2.153	0.5
	D1	2.158		
Калібратор С	E1	1.811	1.791	2
	F1	1.771		
Калібратор D	G1	1.339	1.334	5
	H1	1.329		
Калібратор E	A2	1.024	0.983	10
	B2	0.943		

Калібратор F	C2	0.625	0.624	20
	D2	0.623		
Калібратор G	E2	0.342	0.338	50
	F2	0.334		

Малюнок 1

(Див. в оригіналі інструкції).

## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Абсорбція (OD) калібратора 0 нг/мл повинна бути  $\geq 1.3$ .
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

### 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. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
4. 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.
5. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
6. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
7. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.

### 12.2 Інтерпретація результатів

1. Якщо для інтерпретації результатів тесту використовується аналіз даних, керований комп'ютером, обов'язково, щоб передбачувані значення калібраторів були в межах 10% від призначених концентрацій.
2. Загальна концентрація тироксину в сироватці крові залежить від безлічі факторів: функції щитовидної залози та її регуляції, концентрації тироксинзв'язуючого глобуліну (ТВГ) та зв'язування тироксину з ТВГ. Таким чином, загальної концентрації тироксину недостатньо для оцінки клінічного стану.
3. Загальні показники тироксину в сироватці можуть бути підвищені за таких умов, як вагітність або прийом оральних контрацептивів. Тест на Т3 Urtake може бути проведений для оцінки відносної концентрації ТВГ, щоб визначити, чи підвищений Т4 викликаний варіацією ТВГ.
4. Зниження загальних значень тироксину виявляють при нетиреоїдних захворюваннях, включаючи хвороби, при яких втрачається білок, деякі захворювання печінки та прийом тестостерону, дифенілгдантоїну або саліцилатів. Таблиця інтерферуючих речовин, що заважають лікуванню, та умов, що впливають на загальний вміст тироксину, складена в Журналі Американської асоціації клінічних хіміків.

## 13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції «нормальних» людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити власний діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому розташована лабораторія.

## 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 14.1 Точність

Точність вимірювання Тестової системи High Sensitivity T4 AccuBind® ELISA в аналізі та між аналізами була визначена за допомогою аналізів на трьох різних рівнях контрольних пулованих сироваток. Кількість (N), середнє значення (X), стандартне відхилення ( $\sigma$ ) та коефіцієнт варіації (C.V.) для кожної з цих контрольних сироваток представлені в таблиці 2 та таблиці 3.

ТАБЛИЦЯ 2  
Точність в аналізі (значення в нг/мл)

Зразок	N	X	$\sigma$	CV%
Низький	20	1.05	0.049	4.7
Нормальний	20	2.21	0.138	6.2
Високий	16	4.24	0.18	4.3

ТАБЛИЦЯ 3  
Точність між аналізами (значення в нг/мл)

Зразок	N	X	$\sigma$	CV%
Низький	10	3.0	0.25	8.3
Нормальний	10	8.7	0.32	3.7
Високий	10	16.3	0.69	4.2

\*Виміряно в десяти експериментах у двох примірниках протягом десяти днів.

### 14.2 Чутливість

Тестова система High Sensitivity T4 AccuBind® ELISA має чутливість 18 пг. Це еквівалентно зразку, що містить концентрацію 0.072 нг/мл. Чутливість визначали, визначаючи мінливість калібратора сироватки 0 нг/мл та використовуючи статистику 2 $\sigma$  (95% достовірність) для розрахунку мінімальної дози.

### 14.3 Специфічність

Перехресну реакційну здатність антитіла тироксину до вибраних речовин оцінювали шляхом додавання інтерферуючої речовини до матриці сироватки при різних концентраціях. Перехресну реакційну здатність розраховували, отримуючи співвідношення між дозою інтерферуючої речовини та дозою тироксину, необхідною для витіснення тієї ж кількості кон'югату.

Субстанція	Перехресна реактивність	Концентрація
I-Тироксин	1.0000	-
d-Тироксин	0.9800	10 нг/мл
d-Трийодтиронін	0.0150	100 нг/мл
I-Трийодтиронін	0.0300	100 нг/мл
Лодотирозин	0.0001	100 мкг/мл
Дийодтирозин	0.0001	100 мкг/мл
Дийодтиронін	0.0001	100 мкг/мл



### ВИРОБНИК

Монобайнд, Інс.  
100 Норт-Пуент-Драйв  
Лейк-Форест, Каліфорнія 92630  
Тел: 949.951.2665  
Факс: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)



### 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

