

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТИРОКСИНУ (tT4)

225-300, tT4 Test System

Каталог. №: 225-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 06-11-2012

Версія 3



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

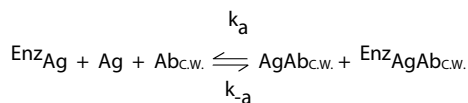
Тест призначений для кількісного визначення концентрації загального Тироксину в людській сироватці або плазмі.

2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз (ТИП 5)

Справжні реагенти, що вимагаються для твердофазового імуноферментного аналізу, включають іммобілізовані антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген. У процесі аналізу при взаємодії лунок, покритих антитілами, кон'югату фермент-антиген і нативного антигену, що міститься в сироватці, відбувається конкуренція між антигеном зразка та кон'югатом фермент-антиген за обмежене число іммобілізованих сайтів зв'язування. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{\text{c.w.}}$ = Моноспецифічні іммобілізовані антитіла (постійна кількість)

Ag = нативний антиген (змінна кількість)

EnzAg = кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

$\text{AgAb}_{\text{c.w.}}$ = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAg Ab}_{\text{c.w.}}$ = Комплекс кон'югат - антитіла

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

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

Після досягнення рівноваги пов'язана з іммобілізованими антитілами фракція відділяється від нез'язаного антигену декантацією або аспірацією. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

4. РЕАГЕНТИ

A. Референсна людська сироватка – 1 мл/флакон

Шість флаконів референсної сироватки з концентраціями T4 0 (A), 2.0 (B), 5.0 (C), 10.0 (D), 15.0 (E) і 25.0 (F) мкг/дл. Зберігати при 2-8 °С. Містять консерванти. Для SI одиниць: мкг/дл x 12.9 = нмоль/л

B. Ферментний реагент T4 – 1.5 мл/флакон

Один флакон, що містить кон'югат тироксину з пероксидазою хрому в розчині бичачого альбуміну - стабілізуючій матриці. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

C. Буфер кон'югату T3/T4 – 13 мл/флакон

Один флакон, що містить буфер, червоний барвник, консервант і білок-зв'язуючий інгібітор. Зберігати при 2-8 °С.

D. Планшет, покритий антитілом T4 – 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий овечою анти-T4 сироваткою і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

F. Субстрат А – 7 мл у флаконі

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

G. Субстрат В – 7 мл у флаконі

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

H. Стоп-розчин – 8.0 мл у флаконі

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Диспенсери змінного об'єму (20-200 мкл) і (200-1000 мкл) для приготування розчинів субстрату і кон'югату.
4. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
6. Тестові пробірки для приготування Ферментного кон'югату.
7. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
8. Пластикові плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
9. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
10. Таймер.
11. Контрольні матеріали.

5. ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будьяких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, NHS.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить кров; сироватка або плазма. Повинні дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °С на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморозування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю, відповідні гіпо-, гіпер і еутиреоїдному діапазонам для відстеження характеристик набору. Ці контролю 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. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Робочий реагент А - Розчин T4-ферментного кон'югата

Розбавте T4-ферментний кон'югат 1:11 буфером в підходящій ємності. Наприклад, змішайте 160 мкл кон'югата з 1.6 мл буфера для 16 лунок

(вийде невеликий надлишок розчину). Цей розчин повинен бути використаний протягом 24 годин. Зберігати при 2-8 °С.

Основна формула:

Необхідна кількість буфера = кількість лунок x 0.1

Необхідна кількість Ферментного кон'югата T4 = n лунок x 0.01, наприклад, = 16 x 0.1 = 1.6 мл для буфера ферментного кон'югата T3/T4 16 x 0.01 = 0.16 мл (160 мкл) для Ферментного кон'югата T4

2. Промивний розчин

Розбавте концентрату розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °С) до 60 днів.

3. Робочий субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °С.

Зауваження 1: не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °С).

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °С.**
- Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте піпеткою по 100 мкл Робочого реагенту А (розчину T4-ферментного кон'югата) у кожну лунку (див. розділ "Приготування реагентів").
- Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст комірок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантација.
- 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 бутылка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте піпеткою по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. "Приготування реагентів"). **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

Зауваження: Для повторного аналізу зразків з концентрацією більш, ніж 25 мкг/дл, додайте 12.5 мкл зразка та 12.5 мкл нульової (0) референсної сироватки в лунки (для підтримки постійної концентрації білка). Отриманий результат слід помножити на 2.

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації T4 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх осередків як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації T4 в мкг/дл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.

- Визначте невідомі концентрації T4 в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція (1.022) перетинає стандартну криву при 8 мкг/дл (див. мал.1).

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (мкг/дл)
Калібратор А	A1	2.648	2.650	0
	B1	2.652		
Калібратор В	C1	2.090	2.060	2
	D1	2.031		
Калібратор С	E1	1.344	1.355	5
	F1	1.366		
Калібратор D	G1	0.897	0.918	10
	H1	0.939		
Калібратор E	A2	0.676	0.668	15
	B2	0.659		
Калібратор F	C2	0.408	0.406	25
	D2	0.404		
Контроль 1	E2	1.425	1.435	4.6
	F2	1.383		
Контроль 2	G2	0.611	0.613	16.3
	H2	0.608		
Пацієнт	A3	0.984	1.022	8.0
	B3	1.060		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1 (Див. оригінал інструкції).

11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність калібратора А має бути ≥ 1.3 .
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

12.1 . Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- 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.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Зразки пацієнтів з концентраціями T4 вищими 35 мкг/дл розводять 0 контрольною сироваткою 1:2 в лунці для зразка; піпетувати 12.5 мкл зразка та 12.5 мкл нульової (0) референсної сироватки в лунки (для підтримки постійної концентрації білка). Отриманий результат слід помножити на 2.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.**

- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Концентрація T4 в крові залежить від багатьох факторів: функції щитовидної залози та її регуляції, концентрації тироксину, зв'язаного з глобуліном (TBG) і зв'язування T4 з TBG. **Таким чином, визначення однієї лише концентрації T4 не є достатнім для оцінки клінічного статусу.**
- Підвищені рівні T4 можуть спостерігатися при вагітності або прийомі оральних контрацептивів. Якщо високий рівень T4 обумовлений варіаціями в концентрації ТСГ, рекомендується виконати T3 uptake тест.
- Знижені рівні спостерігаються при деяких хворобах, пов'язаних з втратою білка, хворобах печінки, прийомі тестостерону, дифенілгідантоїну саліцилатів. Більш докладно про інтерференції лікарських засобів - у спеціальних виданнях.

НАБІР НЕ ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ СКРИНІНГУ НОВОНАРОДЖЕНИХ

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Було проведено дослідження дорослої еутиреоїдної популяції цим набором і отримані наступні результати:

Таблиця 1
Очікувані значення для T4 в мкг/дл

	Чоловіки	Жінки*
N	42	58
Середнє (X)	7.6	8.2
Стандартне відхилення (δ)	1.6	1.7
Очікуваний діапазон (± 2 δ)	4.4-10.8	4.8-11.6

* Нормальні пацієнтки з високим рівнем ТСГ не вилучалися (крім вагітних).

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, що тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору T4 всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (мкг/дл)

Взорець	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	6.87	0.16	2.3
Нормальний	20	9.95	0.16	1.6
Високий	20	13.13	0.17	1.3

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (мкг/дл)

Взорець	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	5.76	0.37	6.3
Нормальний	20	9.41	0.57	6.1
Високий	20	16.18	1.21	7.5

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублікатах на протязі 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу – 3.2 нг/лунку. Це еквівалентно зразку, який містить концентрацію 0.128 мкг/дл для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (мкг/дл) плюс 2σ (σ-стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним радіоімунним методом. Використовувалися зразки від пацієнтів з гіпо-, еу- і гіпертиреозом (діапазон значень від 0.8 до 25 мкг/дл). Загальне число зразків було 131. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для T4 ІФА у порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	8.07	$y = 0.39 + 0.952 (x)$	0.934
Референсний	8.06		

Було знайдено тільки незначну розбіжність даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції методу з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин в сироватку в різних концентраціях. Перехресна реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою тироксину, необхідного для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
I-Тироксин	1.0000	-
d-Тироксин	0.9800	10 мкг/дл
d-Трийодотиронін	0.0150	100 мкг/дл
I-Трийодотиронін	0.0300	100 мкг/дл
Йодотирозин	0.0001	100 мкг/мл
Дійодотирозин	0.0001	100 мкг/мл
Дійодотиронін	0.0001	100 мкг/мл



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

