

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ НЕОНАТАЛЬНОГО Т4 (ТИРОКСИНУ)

2625-300, Neonatal T4 (Thyroxine) Test System

Каталог. №: 2625-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 06-07-2012

Версія 3



Основною 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 (неонатального) в людській цільній крові.

2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

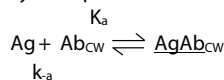
3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Послідовний конкурентний метод ІФА (тип 6):

Необхідні реагенти, що вимагаються для твердофазового імуноферментного аналізу, включають іммобілізовані антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген.

При змішуванні іммобілізованих антитіл і нативного антигену, що міститься в зразках цільної крові, відбувається реакція зв'язування нативного антигену зразка та обмеженого числа іммобілізованих сайтів зв'язування.

Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Ab_{cw} = Моноспецифічні іммобілізовані антитіла (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

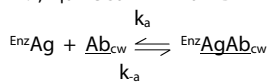
$AgAb_{cw}$ = Комплекс антиген-антитіло

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

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

Після видалення нативного антигену, який не вступив в реакцію, при промиванні, в лунки вносять кон'югат фермент-антиген. Кон'югат взаємодіє з сайтами зв'язування антитіл, що не зайняті нативним антигеном.



$EnzAg$ = Кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

$EnzAgAb_{cw}$ = комплекс кон'югат - антитіла

Після короткої другої інкубації фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від незв'язаного антигену декантуванням 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 в зразках.

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Neo-T4 – точки з висушеної крові (2 ряди по 6 точок різних рівнів – 2 x 6)

Шість рівнів антигену Т4 в точках висушеної крові з концентраціями 0 (A), 1.5 (B), 3.5 (C), 7 (D), 14 (E) і 25 (F) мкг/дл, поміщених на фільтрувальний папір S&S тип 903. Зберігати при 2-8 °C. Містять консерванти.

Зауваження 1: Точні концентрації вказані на зовнішній стороні алюмінієвого пакета.

Зауваження 2: Стандарти специфічні для кожного лота, приготувані на основі цільної людської крові, прокалібровані з використанням

аналітично чистого Т4 (більше 99% за вагою). Цей матеріал перевищує вимоги, встановлені специфікацією USP.

B. Контролі цільної крові – (I, II & III)

Три (3) контрольних зразка тироксину з різними концентраціями (специфічні для кожного лота), приготовлені у вигляді плям цільної крові, поміщені на фільтри S&S 903 (Cat # 903), поставляються в пакеті з фольги, з осушувачем. Допустимі діапазони вказані на етикетці пакету. Зберігати при 2-8 °C. Містять консерванти.

C. Реагент для елюювання Neo-T4:

Один (1) флакон, містить 13 мл буфера з інгібіторами зв'язуючого білка, сурфактантами і консервантами. Зберігати при 2-8 °C.

D. Буфер для кон'югата Neo-T4 – 13 мл у флаконі

Один (1) флакон, містить 13 мл буфера з червоним барвником, сурфактантами і консервантами. Зберігати при 2-8 °C.

E. Ферментний реагент Neo-T4

Один флакон, 1.5 мл, що містить кон'югат тироксину з пероксидазою хрому (HRP) в білковому стабілізуючому розчині, з консервантами. Зберігати при 2-8 °C.

F. Планшет, покритий антитілом tT4 – 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий очищеними мишачими IgG антитілами до тироксину, в алюмінієвому пакеті з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

G. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Зберігати при 2-8 °C.

H. Розчин субстрату – 12 мл у флаконі

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

I. Стоп-розчин – 8.0 мл у флаконі

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N H₂SO₄). Зберігати при 2-30 °C.

J. 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 °C. стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

Зауваження 4: Не використовуйте реагенти, якщо вони каламутні. Вони можуть бути контаміновані.

Зауваження 5: Не заміняйте реагенти з наборів різних лотів.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Лабораторний шейкер на 150 об/хв.
2. Диспенсери на 50, 100 і 350 мкл з точністю не гіршою 1.5%.
3. Диспенсери змінного об'єму (20-200 мкл) і (200-1000 мкл) для розведення кон'югату.
4. Перфоратор з розміром отвору 1/8 дюйма.
5. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
6. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
7. Пробірки для робочого розчину кон'югату.
8. Фільтрувальний папір для висушування лунок.
9. Пластикові плівки або кришки для інкубації мікропланшетів.
10. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивок.
11. Таймер.
12. 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 будь-яких 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

Збирають зразки крові новонароджених з п'яти. Необхідно зібрати об'єм, достатній для заповнення маркованого кружка на фільтрувальному папері марки S & S тип № 903. Отриманий зразок можна висушити через ніч при кімнатній температурі, уникаючи нагрівання і вологості. Транспортувати зразки можна у вологонепроникному пластиковому пакеті з осушувачем. Збір крові проводять на 3-7 день після народження. До зразків повинна бути додана така відомість: дата народження, вага новонародженого; доношена/недоношена дитина, єдина дитина/дитина від багатоплідної вагітності. Ці факти важливі, щоб правильно оцінити тиреоїдний статус. Отримані зразки сухої крові можна зберігати при 2-8 °С протягом 2-3 тижнів у вологонепроникному пластиковому пакеті з осушувачем.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю з рівнями низьким, нормальним і високим 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 постачаються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або розкладанні реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Розчин Робочого реагенту 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 2-3 годин.**

Загальна формула:

Необхідна кількість буфера = кількість лунок x 0.1

Необхідна кількість Ферментного кон'югата NT4 = n лунок x 0.01, наприклад, = 16 x 0.1 = 1.6 мл для буфера ферментного кон'югата NT4 16 x 0.01 = 0.16 мл (160 мкл) для Ферментного кон'югата NT4

2. Промивний розчин

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

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 °C).

- 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 °C.**
- Для кожного стандарту, контролю та зразка перфоратором зробіть отвір діаметром 1/8 дюйма для точок крові на фільтрувальному папері з нанесеними стандартами, контролями і зразками пацієнтів і перенесіть у відповідні лунки планшета. **(Не вирізайте точки на папері за межами маркованої межі та біля краю кров'яної точки).**
- Додайте по 100 мкл Реагенту для елюювання NT4 в кожну лунку.
- Акуратно потрусіть планшет (20 - 30 секунд). **(Переконайтеся, що всі кров'яні точки повністю занурені в рідину і не прилипають до стінок лунок.)**
- Закрийте планшет пластиковою кришкою. Інкубуйте 90 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °C) з струшуванням на шейкері зі швидкістю 150 об/хв. **(Зауваження: або інкубують протягом ночі).**
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація. **ЗАУВАЖЕННЯ: Впевніться, що всі кров'яні точки видалені з лунок.**
- Додайте 350 мкл Промивного Буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще 4 рази (загальна кількість циклів промивки - 5). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний чи ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутылка, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 4 рази.**
- Додайте по 100 мкл Ферментного Реагенту NT4 в кожну лунку.

- Накрийте його пластиковою плівкою і інкубуйте 45 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи лабораторний ротатор зі швидкістю 150 об/хв. **(Зауваження: дивись альтернативний метод інкубації на протязі ночі).**
- Повторіть крок 7.
- Додайте по 100 мкл Субстрату в кожну лунку.
- Накрийте мікропланшет і інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі, без використання лабораторного ротатора.
- 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 в кожній лунці 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 Альтернативний метод інкубації на протязі ночі

- Замініть інкубацію на протязі 90 хвилин на шейкері (крок 5) на інкубацію протягом ночі (12-16 годин). Шейкер не потрібен. Ретельно закрийте планшет пластиковою плівкою.
- Замініть інкубацію на протязі 1 години на інкубацію протягом 45 хвилин з ротацією (крок 8). Шейкер не потрібен.
- Всі інші кроки процедури залишаються без змін.

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Нео-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 (0.719) перетинає стандартну криву при 10.8 мкг/дл (див. мал.1).

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Значення (мкг/дл)
Калібратор А	A1	2.528	2.462	0
	B1	2.398		
Калібратор В	C1	2.082	2.070	1.4
	D1	2.059		
Калібратор С	E1	1.667	1.641	3.2
	F1	1.616		
Калібратор D	G1	1.131	1.094	6.5
	H1	1.058		
Калібратор E	A2	0.648	0.649	13
	B2	0.651		
Калібратор F	C2	0.386	0.387	25
	D2	0.388		
Контроль I	E2	1.874	1.855	2.3
	F2	1.836		
Контроль II	G2	1.447	1.436	4.3
	H2	1.425		
Контроль III	A3	0.830	0.785	9.8
	B3	0.740		
Пацієнт	C3	0.698	0.719	10.8
	D3	0.739		

* 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 калібатора 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.
- 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 розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Грунтуючись на обмеженій кількості зразків, досліджених за допомогою даного методу виробником, а також на опублікованих даних, для новонароджених встановлений діапазон нормальних значень 8-23 мкг/дл.

Важливо враховувати, 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 NT4 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	2.76	0.30	10.9
Нормальний	20	5.15	0.45	8.8
Високий	20	11.30	0.88	7.8

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (мкг/дл)

Взорець	N	x	δ	C.V., %
Низький	10	2.86	0.24	8.4
Нормальний	10	5.24	0.35	6.7
Високий	10	11.10	0.88	7.9

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

14.2 Чутливість

Чутливість методу складає 0.5 мкг/дл. 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 флуоресцентним методом. Використовувалися зразки від пацієнтів з гіпо-, еу- і гіпертиреозом (діапазон значень від 0.5 до 46 мк /дл). Загальне число зразків було 370. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для Neo-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	15.63	$y = 0.604 + 0.941(x)$	0.955
Референсний	15.96		

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 антитіл до тироксину з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин в сироватку в різних концентраціях. Крос-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



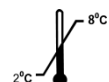
Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

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



© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»