НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЗАГАЛЬНОГО ТИРОКСИНУ В ЦІЛЬНІЙ КРОВІ ЛЮДИНИ (НОВОНАРОДЖЕНИХ)

3150-15, Neo-Natal T4 ELISA

Каталог. №: ***3150-15*** *Методика від* ***05-23-2013***
Кількість : ***96***
Виробник : ***DAI, (США)***

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

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Кількість тестів	**96 тестів**
Тест	**Neo-Natal T4 ELISA**
Метод	**ІФА**
Принцип	**Конкурентний ІФА**
Діапазон визначення	**0-25 мкг/дл**
Зразок	**50 мкл**
Специфічність	**97 %**
Чутливість	**0.05 мкг/дл**
Загальний час	**~ 75 хвилин**
Термін придатності	**12-14 місяців від дати виробництва**

** Лабораторні результати ніколи не можуть бути єдиною базою для медичного висновку. Історія хвороби пацієнта і подальші тести повинні бути прийняті до уваги*

ПРИЗНАЧЕННЯ
Кількісне визначення концентрації Загального Тироксину в цільній крові людини (новонародженої) за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу.

РЕЗЮМЕ І ОПИС *(Див. оригінал інструкції англ. мовою).*

ПРИНЦИП ТЕСТУ
Необхідними реагентами для послідовного імуноферментного аналізу є іммобілізовані антитіла, кон'югат фермент-антиген і нативний антиген. При змішуванні іммобілізованого антитіла і зразка цільної крові, що містить нативний антиген, між нативними антигенами відбувається реакція зв'язування за обмежену кількість сайтів. Взаємодія описується таким рівнянням:

$$Ag + Ab_{CW} \underset{k_{-a}}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} \underline{AgAb}_{CW}$$

$\underline{AB}_{CW}$ = Моноспецифічне іммобілізоване антитіло (постійна величина)
Ag = Нативний антиген (змінна величина)
$\underline{AgAb}_{CW}$ = Комплекс антиген-антитіло
Ka = Постійна асоціації
K-a = Постійна дисоціації
K = Ka / K-a = Постійна рівноваги
Після видалення незреагувавшого нативного антигену на стадії промивки, додається фермент, кон'югований з антигеном. Кон'югат реагує з ділянками антитіл, не зайнятих нативним антигеном.

$$\mathbf{Enz}_{Ag} + \underline{Ab}_{CW} \underset{k_{-a}}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} \mathbf{Enz}\underline{AgAb}_{CW}$$

EnzAg = Ферментний кон'югат антигену (постійна величина)
Enz$\underline{AgAb}_{CW}$ = Комплекс Ферментний кон'югат антигену-антитіло

Після короткої другої інкубації фракція пов'язаного антитіла відділяється від незв'язаного антигену декантацією або аспірацією. Активність ферментів у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи декілька різних калібраторів з відомими концентраціями антигену, можна побудувати калібраційну криву, з якої визначаються концентрації антигену невідомих зразків.

РЕАГЕНТИ
Матеріали, які входять до складу набору:

A. Калібратори Neo-T4 - краплі сухої крові (два ряди по шість крапель - 2 x 6)
Шість (6) рівнів антигену Т4 в сухій крові в приблизних концентраціях 0(**A**), 1.5(**B**), 3.5(**C**), 7(**D**), 14(**E**) і 25 (**F**) мкг/дл на фільтрувальному папері S&S типу 903. Зберігати при температурі 2-8 °C. Консервант був доданий.
Примітка 1: *Точні значення надруковані на зовнішній стороні алюмінієвого пакування.*
Примітка 2: Залежні від партії *значення калібраторів, з основою на цільній людській крові, були відкалібровані при використанні аналітично чистого Т4 (більше 99% по масі). Цей матеріал перевершує технічні умови, встановлені USP.*

B. Контролі Цільної крові - (I, II & III)
Три (3) контролі для Тироксину з різними концентраціями антигену Т4 на фільтрувальному папері S&S типу 903. Зберігати при температурі 2-8 °C. Консервант був доданий.

C. Neo-T4 Буфер для елюції:
Один (1) флакон, що містить 13 мл буфера з інгібіторами зв'язування білків, поверхнево-активні речовини та консерванти. Зберігати при температурі 2-8 ° C.

D. Neo-T4 Кон'югатний буфер - 13 мл
Один (1) флакон, що містить 13 мл буфера, червоний барвник, поверхнево-активні речовини та консерванти. Зберігати при температурі 2-8 ° C.

E. Ферментний реагент NT4 – 1.5 мл/флакон
Один (1) флакон, що містить Кон'югат тироксин-пероксидаза хрону (HRP) в протеїн-стабілізаційній матриці. Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

F. Планшет, покритий Антитілом NT4 - 96 лунок
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий очищеним мишачим антитілом до IgG-тироксину, та упакований в алюмінієвий пакет з осушувачем. Зберігати при температурі 2-8 °C.

G. Концентрат Промивного розчину – 20 мл
Один (1) флакон, що містить сурфактант в буферному розчині. Зберігати при температурі 2-8 °C.

H. Розчин Субстрату – 12 мл/флакон
Один (1) флакон, що містить Тетраметилбензидин (TMB) і перекис водню (H_2O_2) в буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C.

I. Стоп-розчин – 8 мл/флакон
Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (1N H_2SO_4). Зберігати при температурі 2-30 °C.

J. Вкладиш Інструкції

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
Примітка 2: Уникати тривалого впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні протягом 60 (шістдесяти) днів при температурі 2-8 °C.
Примітка 3: Не використовувати реагенти, які виглядають мутними. Вони можуть бути забруднені.
Примітка 4: Не міняйте реагенти між різними партіями.

Необхідні матеріали, що не входять до набору
1. Лабораторний шейкер зі швидкістю обертання 150 об/ хвилину.
2. Диспенсер(и) для повторних внесень об'ємів 0.050 мл, 0.100 мл і 0.350 мл з точністю, більше ніж 1.5% (опційно).
3. Диспенсер(и) для регульованих об'ємів (20-200 мкл) і (200-1000 мкл) розведення кон'югатів.
4. 1/8" папір для нанесення крапель сухої крові.
5. Мікропланшетний вошер або пластикова бутиль (опційно).
6. Зчитувач мікропланшетів з довжиною хвилі 450 нм і 620 нм.
7. Пробірки для приготування робочого ферментного кон'югату.
8. Абсорбуючий папір для декантування лунок мікропланшетів.
9. Плівка або кришка для проведення інкубації.
10. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання.
11. Таймер.
12. Матеріали Контролю якості.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ
Для використання in-Vitro - Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах
Було встановлено, що всі продукти, які містять сироватку крові людини, мають негативну реакцію на Поверхневий антиген гепатиту В, ВІЛ-1 і 2 та антитіла до вірусу гепатиту. Оскільки жоден тест не може дати повної гарантії відсутності інфекційних агентів, всю людську сироватку слід вважати потенційно небезпечною і здатною передавати захворювання.

ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ
Забір проб у новонароджених здійснюється шляхом проколювання п'яток немовляти і нанесенням достатньої кількості цільної крові на

паперову карточку S&S Фільтра (тип # 903), щоб заповнити зазначене коло. Дозволити фільтрувальному паперу висохнути при кімнатній температурі протягом ночі подалі від тепла та вологи. помістити зразок сухої крові (DBS) в поліетиленовий пакет з осушувачем і відправити в лабораторію.
Зразки повинні бути зібрані на протязі 3-7 днів після пологів; фізичні дані, включаючи вік і вагу дитини, будь-то багатоплідні пологи або передчасне народження і т.д. повинні супроводжувати зразок. Це важливо для лікаря, щоб знати ці факти для того, щоб правильно оцінити стан щитовидної залози у дитини. Висушені зразки крові стабільні при температурі 2-8 °C протягом 2-3 тижнів, якщо зберігаються в пакеті з осушувачем.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. **Розчин Робочого Т4-ферментного кон'югату**
   Розвести Т4-ферментний кон'югат 1:11 з Розчинником Neo-T4 в підходящій чистій ємності. Наприклад, розвести 160 мкл Кон'югату з 1.6 мл буфера для 16 лунок (залишиться невеликий надлишок розчину).
   Даний реагент треба використовувати протягом двох-трьох годин для досягнення максимальної продуктивності аналізу.
   Загальна формула:
   Необхідний об'єм буфера = Кількість лунок * 0.1
   Необхідна кількість ферменту Т4 = Кількість лунок * 0.01, тобто = 16 x 0.1 = 1.6 мл для Буфера Кон'югату NT4
   16 x 0.01 = 0.16 мл (160 мкл) для Ферментного кон'югату Т4

2. **Промивний буфер**
   Розбавте вміст розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою в підходящій ємності для зберігання. Зберігати при кімнатній температурі 2-30 °C протягом 60 днів.

Примітка 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він синього кольору.
Примітка 2: Не використовувати реагенти, які забруднені або мають зростання бактерій.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перед проведенням тесту, доведіть все реагенти, контролі і калібраторні сироватки до кімнатної температури (20 - 27 °C).

1. Підготувати лунки мікропланшетів для кожного калібратора, контролю і зразка пацієнта для аналізу в дублікатах. **Помістити невикористані смужки назад в алюмінієву упаковку, закрити і зберігати при температурі 2-8 °C.**
2. Вибити 1/8" кров'яні точки з кожного калібратора, контролю і зразків у відповідні лунки. (**ПРИМІТКА: Не вибивати краплі крові з областей, які знаходяться біля надрукованого матеріалу, або які знаходяться поблизу краю плями крові).**
3. Додати 0.100 мл (100 мкл) Буферу для елюції Neo-T4 в кожну лунку.
4. Обережно повертати планшет протягом 20-30 секунд для перемішування. **(Примітка: Переконайтеся, що всі краплі крові повністю занурені в рідину і не прилипли до стінок лунки).**
5. Накрити плівкою і інкубувати 90 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи лабораторний шейкер при 150 об/хвилину. **(Примітка: дивись альтернативний метод інкубації протягом ночі).**
6. Видалити вміст мікропланшетів декантацією або аспірацією. У разі декантування промокнути планшет абсорбуючим папером. **ПРИМІТКА: Переконайтеся, що всі краплі крові видаляються на цьому етапі. В лунках не повинно залишатися ніякої крові.**
7. Додати 350 мкл розчину для промивання (див. розділ про підготовку реагентів), декантувати або аспірувати. Повторити чотири (4) рази, щоб було в цілому п'ять (5) промивань. **Автоматичне або ручне промивання можна використовувати. Виконувати інструкції виробника з експлуатації. Якщо використовується пластикова бутиль, наповнити кожну лунку стисканням бутилі (уникаючи утворення повітряних бульбашок). Декантувати і повторити іще чотири (4) рази.**
8. Додати 0.100 мл (100 мкл) Ферментного реагенту NT4 в усі лунки.
9. Накрити плівкою і інкубувати 45 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи лабораторний шейкер при 150 об/хвилину. **(Примітка: дивись альтернативний метод інкубації протягом ночі).**
10. Повторити крок промивки №7.
11. Додати 0.100 мл (100 мкл) розчину субстрату в кожну лунку.
12. Накрити плівкою і інкубувати 15 хвилин при кімнатній температурі. **Обертання не потрібно для цього кроку.**
13. Додати 0.050 мл (50 мкл) стоп-розчину в кожну лунку і обережно перемішати протягом 15-20 секунд. **Завжди додавати реагенти в такому ж порядку, щоб мінімізувати відмінності в часі реакції між лунками.**
14. Зчитати абсорбцію в кожній лунці при 450 нм (використовуючи контрольну довжину хвилі 620-630 нм, щоб мінімізувати недоліки). **Вимірювання повинно проводитися протягом п'ятнадцяти (15) хвилин після зупинки реакції.**

Альтернативна нічна процедура:

1. Замінити інкубацією протягом ночі (12-16 годин) ротацію протягом 90 хвилин (крок 5). Ротатор не потрібен. Накрити пластину(и) поліетиленовою плівкою.
2. Замінити 1 годину інкубації на 45 хвилин інкубації з обертанням (Етап 8). Поворотний пристрій не потрібен.
3. Всі інші кроки залишаються тими ж.

ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Крива використовується для визначення Т4 в невідомих зразках.

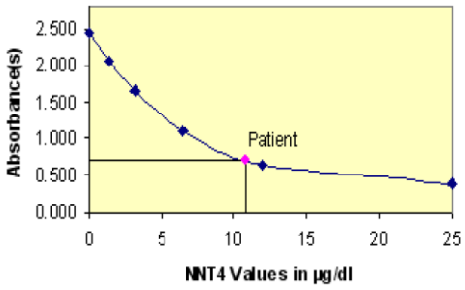
1. Виміряти абсорбцію, отриману з роздруківки мікропланшетного рідера, як описано у прикладі 1.
2. Позначте точками абсорбцію кожного дубліката стандартної сироватки проти відповідної концентрації Т4 в мкг/дл на міліметровому папері (не вираховувати середнє дублікатів стандартів сироватки перед побудовою).
3. З'єднаємо точки в найбільш підходящу криву.
4. Для визначення концентрації Т4 в невідомих зразках, відзначте середню абсорбцію дублікатів кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайти точку перетину на кривій і прочитати концентрації Т4 на горизонтальній осі графіка в мкг/дл. У наступному прикладі, середня щільність (0.719) перетинає криву посилання на 10.8 мкг/дл (див. Малюнок 1).

ПРИКЛАД

Взірець	№ лунки	Абс. (A)	Середнє Абс. (B)	мкг/дл
Кал. A	A1	2.528	2.462	0
	B1	2.398		
Кал. B	C1	2.082	2.070	1.4
	D1	2.059		
Кал. C	E1	1.667	1.641	3.2
	F1	1.616		
Кал. D	G1	1.131	1.094	6.5
	H1	1.058		
Кал. E	A2	0.648	0.649	13
	B2	0.651		
Кал. F	C2	0.386	0.387	25
	D2	0.388		
Контр.1	E2	1.874	1.855	*2.3*
	F2	1.836		
Контр.2	G2	1.447	1.436	*4.3*
	H2	1.425		
Контр.3	A3	0.830	0.785	*9.8*
	B3	0.740		
Пацієнт	C3	0.698	0.719	*10.8*
	D3	0.739		

* Дані, представлені в Прикладі1 і Малюнку1, призначені тільки для ілюстрації і **не повинні** бути використані замість калібрувальної кривої, побудованої для кожного аналізу.

Малюнок 1



ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Для того, щоб результати аналізу вважалися дійсними, наступні критерії повинні бути виконані:

1. Абсорбція (OD) калібратора F повинна бути ≥ 1.3.
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні знаходитися у встановленому діапазоні.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі в низькому, нормальному і високому діапазонах для моніторингу проведення аналізу. Ці Контролі повинні розглядатися як невідомі зразки і значення повинні визначатись в кожній процедурі тесту. Дані Контролю якості повинні зберігатися для подальшої перевірки реагентів, що поставляються. Відповідні статистичні методи варто використовувати для з'ясування тенденцій. Кожна лабораторія повинна встановити власні межі аналізу. Крім того, максимальне поглинання має узгоджуватися з попередніми даними. Значне відхилення від показників вказує на непомічену зміну в умовах проведення аналізу або деградацію реагентів в наборі. Свіжі реагенти повинні бути використані, щоб визначити причину відхилень.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

A. Проведення тесту

1. Важливо, щоб час реакції в кожній лунці підтримувався постійним для досягнення відтворюваних результатів.
2. Піпетування проб не повинно займати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути зсуву результатів тесту.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один (1) планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання розчину субстрату провокує кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп-розчину. Таким чином, субстрат і стоп-розчин мають додаватися в тій же послідовності, щоб усунути будь-які тимчасові відхилення в ході реакції.
6. Планшетний рідер вимірює вертикально. Не торкатися нижньої частини лунок.
7. Недотримання етапу видалення розчину аспірацією або декантуванням може призвести до неточних результатів.
8. Використовуйте компоненти з тієї ж партії. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Точне піпетування, а також дотримання часових проміжків і температурних вимог є суттєвими. Будь-яке відхилення від вказаних інструкцій може привести до неточних результатів.
10. Всі діючі національні стандарти, правила і закони, в тому числі, але не обмежуючись, хороші лабораторні процедури, повинні строго дотримуватись для забезпечення дотримання та правильного використання пристрою.
11. Важливо калібрувати все обладнання, наприклад, Піпетки, читачі, вошери та/або автоматизовані інструменти, які використовуються, і виконувати рутинне профілактичне обслуговування.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

На підставі обмеженої кількості зразків, і як запропоновано в літературі нормальний діапазон для здорових новонароджених встановлений в межах 8 - 23 мкг/дл.

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можуть бути отримані з даним методом для "нормального" населення, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення, яке тестується, точність методу в руках аналітика. З цієї причини кожна лабораторія повинна використовувати діапазон очікуваних значень, встановлених заводом-виробником до тих пір, поки не буде визначений власний діапазон шляхом використання аналітики аналізів людей на території, де розташована лабораторія.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

A. Точність

Точність системи даного тесту в аналізі і між аналізами оцінювалася за допомогою аналізів на трьох різних рівнях контролей сухої крові. Кількість, середнє значення, стандартне відхилення і коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 2 і Таблиці 3.

Таблиця 2
Точність в аналізі (мкг/дл)

Взірець	N	X	SD	CV, %
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)

Взірець	N	X	SD	CV, %
Низький	10	2.86	0.24	8.4
Нормальний	10	5.24	0.35	6.7
Високий	10	11.10	0.88	7.9

***** Дані отримані в десяти експериментах у двох примірниках протягом десяти днів.

B. Точність

Дана тестова система порівнювалась з флуоресцентним методом. Біологічні зразки від гіпотироїдних, еутироїдних і гіпертироїдних пацієнтів були використані (значення варіювали від 0.5 мкг/дл до 46 мкг/дл). Загальна кількість досліджених взірців 370. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції були розраховані для даного методу в порівнянні із звичайним методом. Отримані дані представлені в таблиці 4.

Таблиця 4
Рівняння найменших квадратів

Метод	Середнє (x)	Аналіз	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	15.63	У= 0.604+ 0.941(X)	0.955
Референтний	15.96		

Тільки незначна неузгодженість між цим методом і стандартним методом спостерігалась. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують відмінну узгодженість методів.

C. Чутливість

Чутливість (межа виявлення) оцінюється визначенням мінливості сироваткового калібратора зі значенням 0 мкОд/мл та використання 2σ (95% точності) для розрахунку мінімальної дози. Мінімальна визначна доза складає 0.5 мкг/дл.

D. Специфічність

Перехресна реактивність даного методу на обрані речовини оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю насиченої крові в різних концентраціях. Перехресна реактивність розраховується шляхом отримання відношення між дозою речовини і дозою Тиреотропіну, необхідного для виробництва тої ж абсорбції.

Речовина	Перехресна реактивність		Концентрація
L-тироксин	1.0000	0.9800	----
D-тироксин	0.0150		10 мкг/дл
D-Трийодтиронін	0.0300		100 мкг/дл
L-трийодтиронін	0.0001		100 мкг/дл
Йодотирозин	0.0001		100 мкг/мл
Дійодотирозин			100 мкг/мл

ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

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»