

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТИРОКСИН-ЗВ'ЯЗУЮЧОГО ГЛОБУЛІНУ (ТВГ)

3525-300, Thyroxine Binding Globulin (TBG) Test System

Каталог. №: 3525-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 11-22-2010

Версія 2



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

ПРИЗНАЧЕННЯ

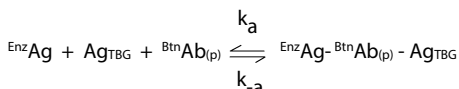
Даний набір призначений для кількісного визначення концентрації Тироксинзв'язуючого Глобуліну ТЗГ (ТВГ) в людській сироватці, плазмі або цільній крові методом імуноферментного аналізу.

ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз:

Необхідні реагенти, що вимагаються для імуноферментного аналізу, включають високоочищені і специфічні антитіла, ферментний кон'югат антигену і нативний антиген. У ході аналізу на поверхні мікролунок відбувається іммобілізація при взаємодії стрептавідину, що покриває лунки, і доданих екзогенних біотинильованих поліклональних антитіл до ТВГ. При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген і нативного антигену, що міститься в сироватці, відбувається конкуренція між нативним антигеном зразка та кон'югатом фермент-антиген за обмежене число іммобілізованих сайтів зв'язування. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{p})}$ = Біотинильовані поліклональні антитіла (надлишкова кількість)

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

EnzAg = Ферменто-мічений антиген (надлишкова кількість)

$\text{EnzAg} \cdot \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{p})} - \text{Ag}_{\text{ТВГ}}$ = Комплекс антиген-антитіло

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

Одночасно в лунках утворюється комплекс при реакції високоафінного стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:

$\text{EnzAg} - \text{Ag}_{\text{ТВГ}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(\text{p})} + \text{Стрептавідин}_{\text{С.В.}} \Rightarrow \text{Іммобілізований комплекс}$

$\text{Стрептавідин}_{\text{С.В.}}$ = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = Комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею.

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

РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

А. Калібратори ТВГ – 0.5 мл у флаконі

Шість флаконів контролю для антигена ТЗГ з концентраціями 1 (А), 4 (В), 8 (С), 16 (D), 32 (E) і 64 (F) мкг/мл. Зберігати при 2-8 °С. Містять консервант.

Зауваження: Стандарти засновані на людській сироватці і були прокалібровані згідно з міжнародним стандартом (IS 88/638).

В. Ферментний реагент ТВГ – 5.5 мл у флаконі

Один флакон, що містить кон'югований з ферментом (HRP) ТВГ в буфері, барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °С.

С. Біотинильовані антитіла – 5.5 мл

Один флакон, що містить біотинильовані антитіла до ТВГ, поліклональні IgG в буфері, барвник, консерванти. Зберігати при 2-8 °С.

D. Мікропланшет, покритий стрептавідином – 96 лунок

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

E. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-30 °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 2-30 °С.

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 10 і 50 мкл з точністю вищою 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гіршою 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор (опційно) для кроків промивання.
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

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 Publication No. (CDC) 88-8395.

ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать кров, сироватка. Повинні дотримуватися звичайних застережних заходів. Для належного 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°C 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 заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях потрібно 0.020 мл зразка.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Розчин для промивання

Вилийте вміст концентрату розчину для промивання в посудину об'ємом 1000 мл. Розбавте до 1000 мл дистильованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (20-27 °С) до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин

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

Зауваження 1: не використовуйте робочий розчин субстрату, якщо він придбав блакитне забарвлення.

ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

1. 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.**
2. Додайте піпеткою по 10 мкл стандартів, розведених контролів та досліджуваних зразків в відповідні лунки.
3. Додайте піпеткою по 50 мкл розчину ТЗГ ферментного реагенту в кожен лунку. Добре перемішайте вміст мікропланшета. **Важливо, щоб всі реагенти додавалися близько до дна лунки.**
4. Додайте 0.050 мл (50 мкл) біотинильованих антитіл в кожен лунку.
5. Добре перемішайте вміст мікропланшета протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
6. Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
7. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальній папері, якщо використовувалася декантація.
8. 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 можна використовувати автоматичний або ручний вошер, відповідно до інструкцій виробника приладів. При використанні гнучкої бутылки заповнюйте кожен лунку до країв, стискаючи контейнер. Уникайте повітряних бульбашок. Декантувати буфер і повторити ще два рази.**
9. Додайте піпеткою по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів").
10. Інкубуйте 15 хв. при кімнатній температурі.
11. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен клітинку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте осередку протягом 15-20 секунд.
12. 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: Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю з рівнями гіпо-, гіпер і еутиреоїдного діапазонів 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.

РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації ТЗГ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації ТЗГ в мкг/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте концентрації ТВГ в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву. Знайдіть середні значення оптичної щільності для дублів кожного зразка на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на калібрувальній кривій і рахуйте концентрацію (в нг/мл) на горизонтальній осі графіка. (див. мал. 1).

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Значення (мкг/мл)
Калібратор А	A1	2.601	2.610	1
	B1	2.619		
Калібратор В	C1	1.672	1.659	4
	D1	1.646		
Калібратор С	E1	1.101	1.103	8

	F1	1.105		
Калібратор D	G1	0.688	0.692	16
	H1	0.697		
Калібратор E	A2	0.389	0.403	32
	B2	0.412		
Калібратор F	C2	0.243	0.237	64
	D2	0.231		
Контроль	E2	0.409	0.410	31.8
	F2	0.411		
Пацієнт 1	G2	0.828	0.491	12.1
	H2	0.835		
Пацієнт 2	A3	0.267	0.273	52.0
	B3	0.280		

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

Малюнок 1 (Див. оригінал інструкції).

ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

1. Оптична щільність калібатора F має бути ≥ 1.3 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

А. Якість набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки не рекомендуються до використання.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. 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.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. 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.
10. Дотримуватися всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. 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.
12. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

В. Інтерпретація результатів

1. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
2. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
3. 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.
4. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для "нормальної" дорослої популяції, очікувані значення при використанні даного методу наведені в таблиці.

Нормальний діапазон

Чоловіки	12 – 26 мкг/мл
Жінки	11 – 27 мкг/мл

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 встановити свій власний діапазон нормальних значень.



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

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

А. Точність

Точність набору ТЗГ всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Число (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/мл)

Взірєць	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	20	4.3	0.16	3.6%
Рівень 2	20	11.8	1.10	9.3%
Рівень 3	20	19.6	1.60	8.2%

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами* (мкг/мл)

Взірєць	N	x	δ	C.V., %
Рівень 1	10	4.6	0.31	6.7%
Рівень 2	10	12.1	1.09	9.0%
Рівень 3	10	21.1	1.01	4.8%

*вимірювання проводились в десяти експериментах.

В. Чутливість

Чутливість визначення TBG склала 1.0 мкг/мл.

С. Специфічність

Перехресні реакції при тестуванні даним методом з різними речовинами оцінювалися додаванням впливають речовин в сироватку в різних концентраціях. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою впливаючої речовини і дозою TBG, необхідного для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність
Білірубін	Не спостерігалась
Ліпіди	Не спостерігалась
Тригліцериди	Не спостерігалась
Людський IgG	Не спостерігалась

Д. Лінійність і Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігався до концентрацій TBG 340 мкг/мл.

Е. Порівняння методів

Даний аналіз порівнювався з затвердженим автоматизованим методом з використанням 167 зразків. Значення знаходились в діапазоні 0 – 97 мкг/мл. Кореляція наведена в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	15.2767	$y = -0.1997 + 1.0192x$	0.991
Референсний	15.3709		



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

