

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТИРОКСИНУ ЗАГАЛЬНОГО SBS МЕТОДОМ ІФА

Total Thyroxine Streptavidin (Total T4 SBS) Test System

Кат. №: 8225-300A

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 4



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

1.0 ПРЕДСТАВЛЕННЯ

Призначення: Кількісне визначення Тироксину загального в зразку сироватки або плазми крові людини за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричний.

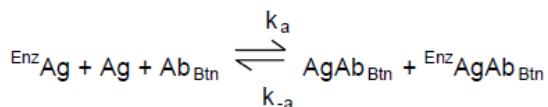
2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз (Тироксин загальний) - ТИП 7

Необхідні для ІФА реактиви включають: антитіла, кон'югат фермент-антиген, нативний антиген і субстрат, який виробляє колір.

При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, відбувається конкурентна реакція між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість зв'язуючих сайтів антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Ab_{Btn} = Анти-Т4-IgG, мічений біотином (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

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

AgAb_{Btn} = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$ = Комплекс кон'югат - антитіла

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

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

Одночасно відбувається реакція між біотином, зв'язаним з антитілом, і стрептавідином, нанесеним в лунках. Це дозволяє відділити зв'язану фракцію антитіл після декантації/аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ - іммобілізований комплекс

Стрептавідин_{CW} = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею.

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.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Strept Тироксину - 1 мл (мл)/флакон

6 флаконів референсного матеріалу для Тироксину з концентраціями 0 (A), 2.0 (B), 5.0 (C), 10.0 (D), 15.0 (E) та 25.0 (F) мкг/дл (µg/dl). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консервант.

Для SI одиниць: мкг/дл (µg/dl) x 12.9 = нмоль/л (nmol/l)

B. Ферментний реагент Strept Тироксину - 1 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон кон'югату Тироксин загальний (аналог)-пероксидаза хрому (HRP) в альбумін-стабілізуючій матриці. Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

- C. **Буфер S-Трийодтиронін/Тироксин - 13 мл (мл)/флакон**
Один флакон (1) реагенту містить буфер, червоний барвник, консервант і інгібітори зв'язування білка. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- D. **Біотиновий Реагент Strept Тироксин - 7 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон містить реагент біотинильованих антитіл до Тироксину (вівці) в білковій стабілізуючій матриці. Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).
- E. **Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок**
Один 96-луночковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в пакет з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- F. **Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- G. **Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C). Див. «Підготовка реагентів».
- H. **Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон, що містить перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C). Див. «Підготовка реагентів».
- I. **Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон**
Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°C).
- J. **Інструкція**

Зауваження 1: Не використовуйте реактиви з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реактиви стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів зазначені на етикетці.

Зауваження 3: Перераховані реактиви є достатніми для одного 96-луночкового мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл (µl)), 0.050 мл (мл) (50 мкл (µl)) та 0.100 мл (мл) (100 мкл (µl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (мл) (100 мкл (µl)) та 0.350 мл (мл) (350 мкл (µl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Дозатори регульованого об'єму (20-200 мкл (µl)) і (200-1000 мкл (µl)) для розведень кон'югату та субстрату.
4. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
6. Пробірки для розведення кон'югату ферменту і субстратів А і В.
7. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
8. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
9. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
10. Таймер.
11. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений 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, ВГС 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», 2-е видання 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитися у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.

6.0 ЗАБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать сироватка або плазма за типом. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірки з червоним ковпачком без/з добавками (для сироватки) та пробірки, що містять ЕДТА або гепарин (для плазми). Дозвольте крові

згорнутися. Для відділення сироватки або плазми від клітин використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (мг)/добу), не слід брати зразки принаймні до 8 годин після останнього введення біотину, бажано на ніч для забезпечення зразка натщесерце.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування. При аналізі в дублях для Тироксину загального потрібно 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівні гіпотиреоїдного, еутиреоїдного та гіпертиреоїдного діапазону для моніторингу результатів аналізу. Ці контролю слід розглядати як невідомі та визначати їх значення в кожній проведеній процедурі тестування. Слід вести діаграми контролю якості, щоб стежити за показниками реагентів, що постачаються. Для встановлення тенденцій слід застосовувати відповідні статистичні методи. 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 Ферментний Реагент - (Тироксин загальний SBS)

Розвести Ферментний Реагент Тироксин загальний SBS 1:11 з буфером s-Трийодтиронін загальний/Тироксин у відповідному контейнері. Наприклад, розвести 0.080 мл (ml) (80 мкл (μl)) кон'югату з 0.800 мл (ml) (800 мкл (μl)) буфера для 16 лунок (з невеликим надлишком розчину). Цей реагент повинен бути використаний протягом двадцяти чотирьох годин для досягнення максимальної продуктивності аналізу. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

Загальна формула:

Необхідний об'єм буфера = кількість лунок * 0.05

Кількість необхідного Ферментного реагенту Тироксину загального = кількість лунок * 0.005, наприклад = 16 x 0.05 = 0.8 мл (ml) (Буфер s-Трийодтиронін загальний/Тироксин) і

16 x 0.005 = 0.08 мл (ml) (80 мкл (μl)) (Ферментний Реагент Тироксину загального).

2. Промивний буфер

Розвести концентрат Промивного буфера до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою в потрібному контейнері. Зберігати розбавлений розчин при 2-30 °C (°C) протягом до 60 днів.

3. Робочий розчин - Стабільний протягом одного (1) року

Влийте вміст бурштинового флакона з розчином «А» у прозорий флакон із розчином «В». Закрийте жовтою кришкою прозорий флакон для зручності ідентифікації. Змішайте і позначте відповідно. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

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

Зауваження 2: Не використовуйте забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

****Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованою людиною або навченим професіоналом****

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, калібраторів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте по 0.025 мл (ml) (25 мкл (μl)) відповідних калібраторів, контролю та зразка у лунки, призначені для Тироксину загального.
- Додайте по 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) розчину Робочого Ферментного реагенту у відповідні лунки (Див. розділ «Підготовка реагентів»).
- Покрутіть мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування та накрийте його.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) розчину кон'югату специфічного антитіла біотинильованого Тироксину загального у відповідні лунки.

- Покрутіть мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування та накрийте його.
- Інкубуйте протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл (μl) промивного буфера (Див. розділ «Підготовка 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 пляшка під тиском, наповнити кожен лунку до верху (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (μl) Робочого розчину субстрату в кожен лунку (Див. розділ «Підготовка реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності, 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 кожен лунку 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: Для повторного аналізу зразків з концентрацією вище найвищого калібратора, розведіть 0.0125 мл (ml) (12.5 мкл (μl)) зразка Тироксину загального і 0.0125 мл (ml) (12.5 мкл (μl)) Тироксину загального «0» референсної сироватки в лунку для зразків (це зберігає однорідну концентрацію білка). Помножте значення зчитування на 2, щоб отримати концентрацію тироксину.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Тироксину в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

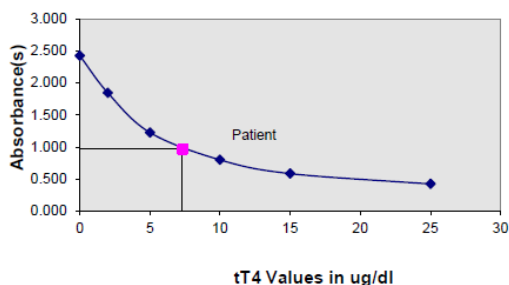
- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Тироксину загального в мкг/дл (μg/dl) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Щоб визначити концентрацію Тироксину загального для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і прочитайте концентрацію (в мкг/дл (μg/dl)) Тироксину загального по горизонтальній вісі графіка (дублікати невідомого можна усереднити, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція 0.963 перетинає криву калібратора при 7.3 мкг/дл (μg/dl) (Малюнок 1).

Примітка: Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ІФА, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (мкг/дл (μg/dl))
Калібратор А	A1	2.451	2.419	0
	B1	2.387		
Калібратор В	C1	1.845	1.839	2
	D1	1.832		
Калібратор С	E1	1.229	1.221	5
	F1	1.213		
Калібратор D	G1	0.811	0.795	10
	H1	0.779		
Калібратор E	A2	0.582	0.581	15
	B2	0.580		
Калібратор F	C2	0.440	0.419	25
	D2	0.398		
Пацієнт	E2	0.960	0.963	7.3
	F2	0.965		

Малюнок 1



tT4 Values in ug/dl - Абсорбція (i)
tT4 Values in ug/dl - Значення Тироксину загального в мкг/дл
Patient - Пацієнт

*Дані наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1 тільки для ілюстрації і **не повинні використовуватися** для побудови стандартної кривої.

11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність Калібратора А повинна бути > 1.3.
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS і форма аналізу ризику для цього продукту доступні за запитом від компанії Monobind Inc.

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. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
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 дозування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, дозаторів, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою за Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ІФА були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та реагентами можуть привести до хибних результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з

клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.

4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. **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.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Значення концентрації сироваткового Тироксину загального залежить від безлічі факторів: функції щитовидної залози і її регуляції, концентрації тироксин-зв'язуючого глобуліну (ТЗГ), і зв'язування Тироксину з ТЗГ. Таким чином, тільки значення концентрації загального тироксину не є недостатнім для оцінки клінічного стану.
8. Значення сироваткового Тироксину загального можуть бути підвищені при таких умовах, як вагітність або застосування оральних контрацептивів. Тест Т3-Uptake може бути проведений для оцінки відносної концентрації ТЗГ з метою визначення, чи підвищення Тироксину загального викликається зміною ТЗГ.
9. Знижені значення Тироксину загального спостерігаються при захворюваннях з білковою недостатністю, деяких захворюваннях печінки, прийомі тестостерону, дифенілгідантоїну або саліцилатів. Таблиця інтерферуючих ліків і умов, які впливають на значення Тироксину загального, була складена Журналом Американської асоціації клінічних хіміків.

«НЕ ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ ОБСТЕЖЕННЯ НОВОНАРОДЖЕНИХ»

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Вивчення еутиреоїдного дорослого населення було проведено для визначення очікуваних значень. Середні значення (R), стандартні відхилення (σ) і очікувані діапазони (± 2σ) представлені в Таблиці 1.

ТАБЛИЦЯ 1

	Чоловіки	Жінки*
Середнє (X)	7.6	8.2
Стандартне відхилення (σ)	1.6	1.7
Очікувані діапазони (± 2σ)	4.4-10.8	4.8-11.6
Кількість	42	58

*Звичайні пацієнти з високим рівнем ТЗГ не були виключені за винятком випадків вагітності.

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для сукупності «нормальних» осіб, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, сукупності перевірених і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому знаходиться лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність Тест-системи Тироксин загальний SBS AccuBind® ІФА всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (σ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в Таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (мкг/дл (µg/dl))

Зразок	N	x	σ	C.V., %
Низький	16	3.1	0.21	6.7
Нормальний	16	8.9	0.27	3.0
Високий	16	16.5	0.73	4.4

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами (мкг/дл (µg/dl))

Зразок	N	x	σ	C.V., %
Низький	10	3.0	0.25	8.3
Нормальний	10	8.7	0.32	3.7
Високий	10	16.3	0.69	4.2

*Вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях протягом 10 днів.

