

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТИРОКСИН-ЗВ'ЯЗУЮЧОГО ГЛОБУЛІНУ МЕТОДОМ ІФА

Thyroxine Binding Globulin (TBG) Test System

Кат. №: 3525-300A

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



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

1.0 ПРЕДСТАВЛЕННЯ

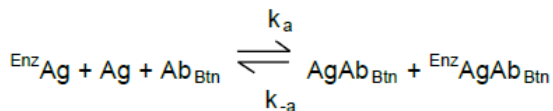
Призначення: Кількісне визначення концентрації Тироксин-зв'язуючого глобуліну (ТЗГ) у сироватці, плазмі або цільній крові людини за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричного.

2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз (ТИП 7):

Основні реагенти, необхідні для імуноферментного аналізу, включають антитіло, кон'югат фермент-антиген та нативний антиген. При змішуванні біотинильованого антитіла, кон'югату фермент-антиген та сироватки, що містить нативний антиген, виникає реакція конкуренції між нативним антигеном та кон'югатом фермент-антиген за обмежену кількість сайтів зв'язування антитіл. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Ab_{Btn} = Біотинильоване антитіло (Постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (Змінна кількість)

EnzAg = Кон'югат Фермент-антиген (Постійна кількість)

AgAb_{Btn} = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$ = Кон'югат Фермент-антиген-Комплекс антитіл

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

$K = k_a/k_{-a}$ = Постійна рівноваги

Виникає одночасна реакція між біотином, прикріпленим до антитіла, та стрептавідином, іммобілізованим у мікролуночці. Це впливає на поділ фракції, пов'язаної з антитілами, після декантації або аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{с.в.}} \Rightarrow$ Іммобілізований комплекс

Стрептавідин_{с.в.} = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

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

Активність ферментів у фракції, пов'язаній з антитілами, обернено пропорційна концентрації нативного антигену. За допомогою декількох різних референсів сироватки відомих концентрацій антигену може бути сформована крива реакції на дозу, з якої можна встановити невідому концентрацію антигену.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори ТЗГ - 0.5 мл (мл)/флакон

Шість флаконів референсного матеріалу для антигена ТЗГ з концентраціями 1 (A), 4 (B), 8 (C), 16 (D), 32 (E) і 64 (F) мкг/мл (µg/ml). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консервант.

Зауваження: Калібратори на основі людської сироватки були прокалібровані згідно з міжнародним стандартом (IS 88/638).

B. Ферментний реагент ТЗГ - 5.5 мл (мл)/флакон

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

C. Біотиновий реагент антитіл ТЗГ - 5.5 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон з міченим біотином поліклональним IgG анти-ТЗГ у буфері, з барвником та консервантами. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Мікропланшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

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

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C). Див. «Підготовка реагентів».

G. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C). Див. «Підготовка реагентів».

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

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

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

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

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор зі здатністю подавати об'єми 0.010 і 0.050 мл (мл) (10 & 50 мкл (µl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Багатоканальний диспенсер(и) для постачання об'ємом 0.100 та 0.350 мл (мл) (100 & 350 мкл (µl)) з точністю до 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор (опційно) для кроків промивання.
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 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, 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 Publication No. (CDC) 88-8395.

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

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить сироватка крові. Повинні дотримуватися звичайних застережних заходів. Для належного порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірці з червоним ковпачком без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/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. Для аналізу в дублях потрібно 0.020 мл (ml) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. 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.

8.0 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Розчин для промивання

Вилийте вміст концентрату розчину для промивання в посудину об'ємом 1000 мл (ml). Розбавте до 1000 мл (ml) дистильованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

2. 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 °C (°C).

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

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

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

****Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем****

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 10 мкл (μl) відповідного сироваткового референсного калібратора, розведеного контролю або досліджуваного зразка в відповідні лунки.
- Додайте піпеткою по 50 мкл (μl) розчину Ферментного реагенту ТЗГ в кожен лунку. Добре перемішайте вміст мікропланшета. Важливо, щоб всі реагенти додавалися близько до дна лунки.
- Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) біотинильованих антитіл в кожен лунку.
- Добре перемішайте вміст мікропланшета протягом 20-30 секунд і накрийте його поліетиленовою плівкою.
- Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальній 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 можна використовувати автоматичний або ручний вошер, відповідно до інструкцій виробника приладів. При використанні пляшки під тиском заповнюйте кожен лунку до країв, стискаючи контейнер. Уникайте утворення повітряних бульбашок. Декантувати буфер і повторити ще два рази.
- Додайте піпеткою по 100 мкл (μl) Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. «Підготовка реагентів»).
- Інкубуйте 15 хв. при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен клітинку 50 мкл (μl) стоп-розчину і перемішайте осередку протягом 15-20 секунд.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Вимірювання 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.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації ТЗГ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

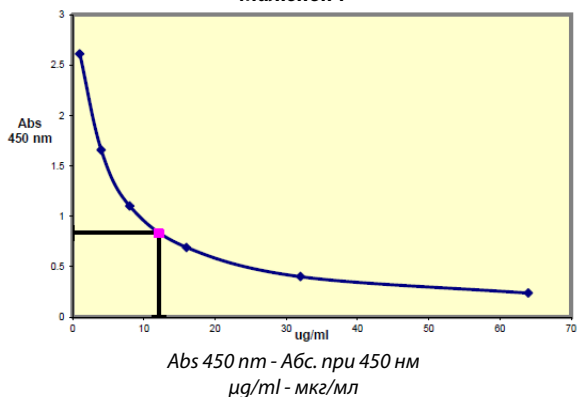
- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації ТЗГ в мкг/мл (μg/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації ТЗГ 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 (ng/ml)) на горизонтальній осі графіка. (див. Малюнок 1).

Примітка: Для аналізу даних може використовуватися комп'ютерне програмне забезпечення, розроблене для аналізу ІФА. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Значення (мкг/мл (μg/ml))
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 Е	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		

Малюнок 1



*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:

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

12.0 ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

Форма MSDS та аналізу ризиків для цього продукту доступна за запитом від Monobind Inc.

А. Якість набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки не рекомендуються до використання.
- 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.
- Дотримуватися 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 - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

В. Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.
- 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 знаходитися в межах встановлених норм.
- Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ІФА були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тестовими реагентами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто спричиняють ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. (Boscato LM Stuart MC. «Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays» Clin. Chem 1988:3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу слід використовувати у поєднанні з клінічним обстеженням, історією хворого та усіма іншими клінічними даними.
- 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 відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

13.0 ОЧІКУВАНІ ДІАПАЗОНИ ЗНАЧЕНЬ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для «нормальної» дорослої популяції, очікувані значення при використанні Тест-системи ТЗГ AccuBind® ІФА наведені в таблиці.

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для Тест-системи ІФА ТЗГ AccuBind®

Нормальний діапазон	
Чоловіки	12- 26 мкг/мл (µg/ml)
Жінки	11-27 мкг/мл (µg/ml)

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 ТЗГ AccuBind® ІФА 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 (µg/ml))

Зразок	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 (µg/ml))

Зразок	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.

14.2 Чутливість

Тест-система ІФА ТЗГ AccuBind® має чутливість 1.0 мкг/мл (µg/ml). Чутливість була встановлена шляхом визначення мінливості «0» калібратора та використання статистики 2σ (95% достовірності) для розрахунку мінімальної дози.

14.3 Достовірність

Тест-систему ТЗГ AccuBind® ІФА порівнювали з референсним методом. Були використані біологічні зразки (n=167) із популяції (симптоматичні та безсимптомні). Значення коливались від 0 до 97 мкг/мл (µg/ml). Кореляція представлена в таблиці 4.

Таблиця 4

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

14.4 Специфічність

Перехресну реакційну здатність Тест-системи ТЗГ AccuBind® ІФА на вибрані речовини оцінювали шляхом додавання інтерферуючої речовини до об'єднаної сироваткової матриці при різних концентраціях. Перехресну реакційну здатність розраховували, отримуючи співвідношення між дозою інтерферуючої речовини та дозою ТЗГ, необхідною для отримання однакової поглинання.

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

14.5 Лінійність і Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігався до концентрацій ТЗГ 340 мкг/мл (µg/ml) в сироватці чи плазмі.



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
100 North Pointe Dr.
Lake Forest, CA 92630 - USA
Phone: 949.951.2665
Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
100 Норд Поінт Драйв
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США
Тел.: 949.951.2665
Факс: 949.951.3539
www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

