

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЗАГАЛЬНОГО ТИРОКСИНУ

8225-300, Total Thyroxine (Total T4 SBS) Test System

Каталог. №: **8225-300**

Кількість : **96**

Виробник : **Monobind Inc., (США)**

Методика від **15-04-2013**

Версія **3**



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення концентрації Загального Тироксину в сироватці або плазмі людини з використанням мікропланшетного ферментного імуноаналізу, колориметричний.

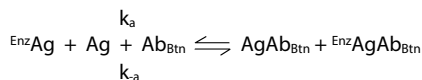
2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноферментний аналіз (ТИП 7):

Необхідні для ІФА реагенти 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:



$\text{Ab}_{\text{Btн}}$ = Біотинильовані х-анти Т3 IgG антитіла (постійна кількість)

Ag = Нативний антиген (змінна кількість)

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

$\text{AgAb}_{\text{Btн}}$ = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btн}}$ = 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, прикріпленим до антитіл, і стрептавідином, прикріпленим до мікролунок. Це дозволяє відділити зв'язану фракцію антитіл після декантації/аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btн}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btн}} + \text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ – іммобілізований комплекс

$\text{Стрептавідин}_{\text{CW}}$ = 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. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори tT4 - 1 мл/флакон

6 флаконів референтної сироватки (стандартів) з концентраціями Т3 0 (A), 2.0 (B), 5.0 (C), 10.0 (D), 15.0 (E) і 25.0 (F) мкг/дл. Зберігати при 2-8 °С. Містять консервант.

Для SI одиниць: мкг/дл x 12.9 = нмоль/л

B. Ферментний реагент tT4 SBS – 1 мл/флакон

Один (1) флакон кон'югату tT4 (аналог)-пероксидаза хрому (HRP) в стабілізуючій білковій матриці. Містять консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

C. Буфер sT3/T4 - 13 мл/флакон

Одна пляшка (1) реагенту містить буфер, червоний барвник, консервант і інгібітори зв'язуючого білка. Зберігати при температурі 2-8 °С.

D. Біотиновий Реагент tT4 SBS - 7 мл/флакон

Один (1) флакон містить реагент біотинильованого анти-тироксину (вівці) в білковій стабілізуючій матриці. Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

E. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

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

F. Концентрат розчину для промивання - 20 мл/флакон

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

G. Субстрат А - 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

H. Субстрат В - 7 мл/флакон

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

I. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

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

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 °С. стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25, 50 і 100 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 300 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Дозатори регульованого об'єму (20-200 мкл) і (200-1000 мкл) для розведення кон'югату та субстрату.
4. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
5. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
6. Пробірки для розведення кон'югату ферменту і субстратів А і В.
7. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
8. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
9. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
10. Таймер.
11. Контрольні матеріали.

5. 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, 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.

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

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать сироватка або плазма крові. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без/з добавками (для сироватки) та пробірки, що містить ЕДТА або гепарин (для плазми). Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу. Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С 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 вимагається 0.050 мл зразка.

7. 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. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Робочий Ферментний Реагент - (tT4 SBS)

Розвести Ферментний Реагент tT4 SBS 1:11 з буфером sT3/T4 у відповідному контейнері. Наприклад, розвести 0.080 мл (80 мкл) кон'югату з 0.800 мл (800 мкл) 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.

Загальна формула:

Необхідний об'єм буфера = кількість лунок * 0.05

Кількість tT4 необхідного ферменту = кількість лунок * 0.005, наприклад = 16 x 0.05 = 0.8 мл (800 мкл) (sT3/T4 буфера) і 16 x 0.005 = 0.08 мл (80 мкл) (Ферментний Реагент tT4).

2. Промивний буфер

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

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

Залити вміст флакона розчину 'A' у флакон розчину 'B'. Змішати і зберігати при температурі 2-8 °C. Використовувати протягом 60 днів. Або для більш тривалих періодів використання визначити необхідну кількість реагенту і підготувати шляхом змішування рівних частин Субстрату A і Субстрату B в потрібному контейнері. Наприклад, додайте 1 мл A і 1 мл B на дві (2) восьми-лунокові смужки (розчин готується з невеликим надлишком. Викиньте невикористану частину).

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

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

9. 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 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 50 мкл Ферментного реагенту tT4 у кожен лунку.
4. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
5. Додайте 0.050 мл (50 мкл) Біотинового Реагенту tT4 в усі лунки.
6. Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування.
7. Інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
8. Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
9. 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 краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутылка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
10. Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

11. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
12. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен 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.**
13. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводите при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

Примітка: Для повторного аналізу зразків з концентрацією вище найвищою калібровача, розведіть 0.0125 мл (12.5 мкл) зразка tT4 і 0.0125 мл (12.5 мкл) tT4 '0' референтної сироватки в лунку для зразків (це зберігає однорідну концентрацію білка). Помножте значення зчитування на 2, щоб отримати концентрацію тироксину.

10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації tT4 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 густин для кожного стандарту залежно від концентрації tT4 в мкг/дл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте концентрації tT4 в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.963 перетинає стандартну криву при 7.3 мкг/дл (див. мал.1)

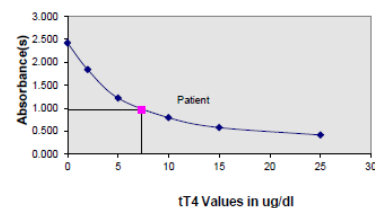
Примітка: Програмне забезпечення може також бути використане для перетворення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

Приклад 1

Взорець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (мкг/дл)
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		

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

Figure 1



11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність Калібровача А «0» мкг/дл повинна бути > 1.3
2. 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 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.
- Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ELISA були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенціальна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових 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.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролі 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 розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Значення концентрації сироваткового tT4 залежить від безлічі факторів: функції щитовидної залози і її регуляції, концентрації тироксин-зв'язуючого глобуліну (TBG), і зв'язування тироксину до TBG. Таким чином, тільки значення концентрації загального трийодтироніну не є недостатнім для оцінки клінічного стану.
- Значення сироваткового tT4 можуть бути підвищені при таких умовах, як вагітність або застосування оральних контрацептивів. Тест на поглинання T3U може бути проведений для оцінки відносної концентрації TBG з метою визначення, чи підвищений tT4 викликається зміною TBG.
- Знижені значення tT4 спостерігаються при захворюваннях з білковою недостатністю, деяких захворюваннях печінки, прийомі тестостерону, дифенілгдантоїну або саліцилатів. Таблиця інтерферуючих ліків і умов, які впливають на значення tT4, була складена Журналом Американської асоціації клінічних хіміків.

"НЕ ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ ОБСТЕЖЕННЯ НОВОНАРОДЖЕНИХ"

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

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 - Очікувані значення

	Male	Female *
Mean (X)	7.6	8.2
Std Dev (σ)	1.6	1.7
Expected Ranges (±2σ)	4.4 – 10.8	4.8 – 11.6
Number	42	58

* Нормальні пацієнти з високим рівнем TBG були виключені за винятком випадків вагітності.

Важливо мати на увазі, що створення очікуваного діапазону значень для нормального населення залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення і точності методу в руках оператора. З цих причин кожна лабораторія повинна орієнтуватись на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору tT4 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)**

Взорець	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)**

Взорець	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.

14.2 Чутливість

Чутливість методу – 0.4 мкг/дл для даного набору.

14.3 Достовірність

Дану тестову систему порівнювали референтним методом. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для ELISA в порівнянні з еталонними методами. Отримані дані представлені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	8.07	$Y = 0.39 + 0.952(X)$	0.934
Метод порівняння	8.06		

**Діапазон значень 0.8 – 25
Кількість: 131**

Тільки незначні розбіжності між даним аналізом і еталонним методом свідчать про близькість середніх значень. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції показують відмінну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

% перехресної реактивності антитіл tT4 на вибрані речовини оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в різних концентраціях. Перехресна реактивність була обчислена шляхом виведення відношення між дозою додаткової речовини і дозою tT4, необхідної для витіснення такої ж кількості міченого аналога.

Substance	Cross Reactivity	Concentration
l-Thyroxine	1.0000	-
d-Thyroxine	0.9800	10µg/dl
d-Triiodothyronine	0.0150	100µg/dl
l-Triiodothyronine	0.0300	100µg/dl
Iodothyrosine	0.0001	100µg/ml
Diiodothyrosine	0.0001	100µg/ml
Diiodothyronine	0.0001	100µg/ml



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

