

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТИРОКСИНЗВ'ЯЗУЮЧОГО ГЛОБУЛІНУ ЛЮДИНИ (НОВОНАРОДЖЕНИХ) (ТВГ)

## 8925-300, Neonatal Thyroxine Binding Globulin (N-TBG) Test System

Каталог. №: 8925-300

Методика від 10-07-2012

Кількість : 96

Версія 0

Виробник : Monobind Inc., (США)



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

### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення концентрації Тироксинзв'язуючого Глобуліну людини (новонароджених) (ТВГ) в цільній крові за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу.

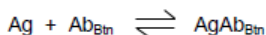
### 2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

### 3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Конкурентний імуноаналіз з затримкою (тип 9):

Необхідні реагенти для імуноферментного аналізу включають антитіла високої спорідненості і специфічності, мічені ферментами антигени і нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час тесту на поверхні лунки мікропланшетів при взаємодії стрептавідину, нанесеного в лунку, і додавання ззовні поліклональних антитіл анти-ТВГ.

Спочатку змішуються вивільнюючий буфер і пляма сухої крові, що містить нативний антиген, таким чином, щоб антиген був доступний для подальшої реакції. Після інкубації поліклональні біотинильовані антитіла додають безпосередньо в елююваний зразок, що містить нативний антиген. Під час іншої стадії інкубації відбувається реакція між антигеном і антитілом, як показано в наступному рівнянні:

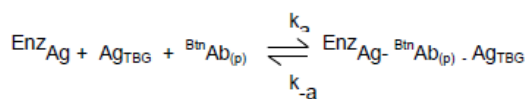


$Ab_{B_{tn}}$  = Біотинильовані антитіла

$Ag$  = Антиген (змінна кількість)

$AgAb_{B_{tn}}$  = Імунний Комплекс

Потім додають антигени, мічені ферментом, при цьому відбувається конкуренція між нативним антигеном і міченими ферментом антигенами за обмежену кількість специфічних сайтів зв'язування за антитіла, не задіяні в першій інкубації. Після інкубації антиген-пов'язані антитіла прикріплюються до поверхні пластикових лунок через мітку біотину на ньому і стрептавідин, який присутній на пластику. Взаємодія описується наступним рівнянням:



$B^{tn}Ab_{(p)}$  = біотинильоване поліклональне антитіло (надлишкова кількість)

$Ag_{TBG}$  = нативний антиген (змінна кількість)

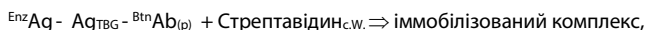
$EnzAg$  = ферментно-мічений антиген (надлишкова кількість)

$EnzAg - B^{tn}Ab_{(p)} - Ag_{TBG}$  = Комплекс антиген-антитіло

$k_a$  = Константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Константа швидкості дисоціації

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



Стрептавідин<sub>c.w.</sub> = Стрептавідин, нанесений в лунки  
Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. 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 невідомих зразків.

### 4. РЕАГЕНТИ

#### Матеріали, що постачаються:

#### A. Калібратори N-TBG – Плями висушеної крові (два ряди по шість точок різних рівнів - 2 x 6)

Шість (6) рівнів калібраторів N-TBG в сухих плямах крові в приблизних концентраціях 0 (A), 50 (B), 100 (C), 200 (D), 375 (E) і 750 (F) нмоль/л розміщені на S&S фільтрувальному папері типу 903. Зберігати при температурі 2-8 °C. Містить консервант.

**Примітка 1:** Точні значення зазначені на зовнішній стороні алюмінієвого мішечка.

**Примітка 2:** Калібратори, *специфічні для окремого лота*, на основі цільної людської крові, були відкалібровані при використанні аналітично чистого TBG (більш ніж 99% за масою). Цей матеріал перевершує технічні умови, встановлені USP.

#### B. Контролі цільної крові - (I, II & III)

Три (3) контролю для TBG в різних концентраціях (специфічні для партії), приготовлені в плямах висушеної крові на S&S фільтрувальному папері типу 903, що постачаються в пакеті з фольги з осушувачем. Див. етикетку щодо діапазонів для різних контролів.

Зберігати при температурі 2-8 °C. Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

#### C. Буфер для елюції N-TBG - 6.0 мл

Один (1) флакон, що містить 6.0 мл буфера з консервантами. Зберігати при температурі 2-8 °C.

#### D. Біотиновий Реагент N-TBG – 6.0 мл

Один (1) флакон, що містить х-TBG в буфері з синім барвником, ПАР і консервантами. Зберігати при температурі 2-8 °C.

#### E. Ферментний Реагент N-TBG – 6.0 мл/фл

Один (1) флакон кон'югату TBG -пероксидаза хрону (HRP) в білок-стабілізуючій матриці. Містить консерванти і червоний барвник. Зберігати при температурі 2-8 °C.

#### F. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

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

#### G. Концентрат розчину для промивання - 20 мл/флакон

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

#### H. Субстратний Розчин - 13 мл/флакон

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

#### I. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Зберігати при 2-8 °C.

#### J. Інструкція

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

**Зауваження 2:** Відкриті реагенти стабільні протягом 60 (шістдесят) днів при зберіганні при температурі 2-8 °C. Комплект і стабільність компонентів позначені на етикетці.

**Зауваження 3:** Не замінювати реагенти між різними партіями.

#### 4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Лабораторний шейкер зі швидкістю 150 об./хв.
2. Мікродозатори на 50, 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Дозатори регульованого об'єму (20-200 мкл) і (200-1000 мкл) для розведень кон'югату.
4. 1/8 дюйма дирикол.
5. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
6. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
7. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
8. Пластикові плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
9. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
10. Таймер.

11. Зовнішні 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, HHS.

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

## 6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Збір зразків новонароджених проводиться з п'яти. Необхідно зібрати обсяг, достатній для заповнення маркованого кружка на фільтрувальному папері марки S&S тип 903. Висушити фільтрувальний папір при кімнатній температурі протягом ночі далеко від джерел тепла і вологості. Помістити сухі зразки крові (DBS) в сухий поліетиленовий пакет з осушувачем і відправити в лабораторію. Зразок повинен бути отриманий протягом 3-7 днів після пологів. Фізичні дані про вік і вагу дитини, багатоплідні роди, передчасні пологи і т.д. повинні супроводжувати зразок. Ці факти є важливими для клініциста, щоб правильно оцінити стан щитовидної залози у дитини.

Висушені зразки крові стабільні при температурі 2-8 °C протягом 2-3 тижнів при зберіганні в закритому вологостійкому мішечку з осушувачем.

## 7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контрольні на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контрольні 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. Промивний буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

**Зауваження 1: Не використовуйте робочий 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 контрольні повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

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

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контрольів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.**
2. Для кожного стандарту, контролю та зразка перфоратором виріжте диски діаметром 1/8 дюйма для точок крові на фільтрувальному папері з нанесеними стандартами, контролями і зразками пацієнтів і перенесіть у відповідні лунки планшета. **(Не вирізайте точки на папері за межами маркованої межі та біля краю кров'яної точки).**
3. Додайте по 50 мкл буфера для елюції N-TBG в кожен лунку.
4. Акуратно потрусіть планшет (20-30 секунд). **(Переконайтеся, що всі кров'яні точки повністю занурені в рідину і не прилипають до стінок лунок.)**

5. Закрийте планшет пластиковою кришкою. Інкубуйте 60 хвилин при температурі навколишнього середовища з струшуванням на шейкері зі швидкістю 150 об/хв. **(Примітка: див. альтернативну інкубацію протягом ночі).**

6. Додати 50 мкл Біотинового реагенту N-TBG безпосередньо в кожен лунку **(НЕ виливати будь-які реагенти, які вже є в лунці)** і потрусити планшет акуратно протягом 20-30 секунд, щоб перемішати.

7. Накрити мікропланшет і інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. **Обертання не потрібно для цього кроку.**

8. Додати 50 мкл Ферментного реагенту N-TBG безпосередньо в кожен лунку **(НЕ виливати будь-які реагенти, які вже є в лунці)** і потрусити планшет акуратно протягом 20-30 секунд, щоб перемішати.

9. Накрити мікропланшет і інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. **Обертання не потрібно для цього кроку.**

10. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.

11. Додайте 350 мкл Промивного Буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще 4 рази (загальна кількість циклів промивки - 5). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний чи ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 4 рази.**

12. Додайте по 100 мкл Субстрату в кожен лунку.

13. Накрийте мікропланшет і інкубуйте 15 хвилин при температурі навколишнього середовища. **Обертання не потрібно для цього кроку.**

14. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і обережно 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.**

15. Виміряйте величини поглинання в кожній лунці на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.**

## 9.1 АЛЬТЕРНАТИВНА ТЕСТОВА ПРОЦЕДУРА – ІНКУБАЦІЯ ПРОТЯГОМ НОЧІ

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контрольів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.**
2. Для кожного стандарту, контролю та зразка перфоратором виріжте диски діаметром 1/8 дюйма для точок крові на фільтрувальному папері з нанесеними стандартами, контролями і зразками пацієнтів і перенесіть у відповідні лунки планшета. **(Не вирізайте точки на папері за межами маркованої межі та біля краю кров'яної точки).**
3. Додайте по 50 мкл буфера для елюції N-TBG в кожен лунку.
4. Акуратно потрусіть планшет (20-30 секунд). **(Переконайтеся, що всі кров'яні точки повністю занурені в рідину і не прилипають до стінок лунок.)**
5. Закрийте планшет пластиковою кришкою. Інкубуйте 60 хвилин при температурі навколишнього середовища з струшуванням на шейкері зі швидкістю 150 об/хв.
6. Накрийте плівкою і інкубуйте протягом ночі при кімнатній температурі.
7. Дотримуйтесь кроків 6-15 "Протоколу Аналізу" вище.

## 10. РЕЗУЛЬТАТИ

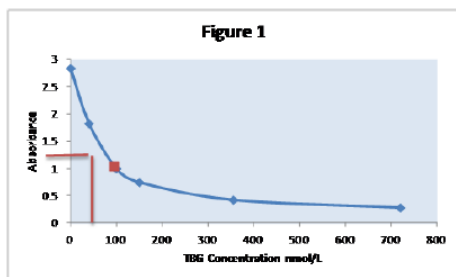
Для визначення концентрації N-TBG в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

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 N-TBG в нмоль/л (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте концентрації N-TBG в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.39 перетинає стандартну криву при 127.27 нмоль/л (див. мал.1)

Приклад 1

Взірець	Лунка	Абсорбція (А)	Середнє абсорбції (В)	Концентрація нмоль/л
Калібратор А	A1	2.805	2.72	0
	B1	2.636		
Калібратор В	C1	1.919	2.01	48
	D1	2.124		
Калібратор С	E1	1.689	1.58	94
	F1	1.461		
Калібратор D	G1	1.009	1.09	188
	H1	1.177		
Калібратор E	A2	0.580	0.61	375
	B2	0.641		
Калібратор F	C2	0.389	0.38	750
	D2	0.362		
Контроль I	E2	2.091	1.96	52.75
	F2	1.833		
Контроль II	G2	1.433	1.49	108.12
	H2	1.549		
Контроль III	A3	0.940	0.97	223.98
	B3	0.990		
Зразок	C3	1.250	1.39	127.27
	D3	1.575		

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



## 11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність Калібратора 0 нмоль/л повинна бути  $\geq 1.3$ .
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

### 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. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
4. 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.
5. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
6. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
7. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
8. 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.
9. Дотримуватися всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
10. 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.
11. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

## 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. Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
4. 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.
5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

## 13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених довідкових інтервалів для "нормальної" педіатричної популяції очікувані діапазони для тестової системи AccuBind® N-TBG докладно описані в таблиці 1. Одиниці можуть бути перетворені з використанням коефіцієнта перетворення 18.5.

ТАБЛИЦЯ 1  
Орієнтовні інтервали залежно від віку для N-TBG

Age	N-TBG – in nmol/L		N-TBG – in µg/mL	
1 – 7 days	116.6	– 399.6	6.3	– 21.6
8 – 15 days	220.0	– 442.9	11.9	– 23.9
1 mo – 3 yrs	235.1	– 571.7	12.7	– 30.9
4 – 6 yrs	272.5	– 608.7	14.7	– 32.9
7 – 8 yrs	301.7	– 568.0	16.3	– 30.7
9 – 10 yrs	291.6	– 519.9	15.8	– 28.1
11 yrs	285.6	– 506.9	15.4	– 27.4
12 yrs	273.4	– 483.6	14.8	– 26.1
13 yrs	255.3	– 466.8	13.8	– 25.2
14 yrs	226.1	– 166.2	12.2	– 9.0
15 yrs	199.8	– 451.4	10.8	– 24.4
16 yrs	185.0	– 440.3	10.0	– 23.8
17 yrs	157.3	– 427.4	8.5	– 23.1
18 – 19 yrs	142.3	– 392.2	7.7	– 21.2

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 орієнтуватися на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

## 14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

### 14.1 Точність

Точність набору N-TBG всередині серії і між серіями визначалася в аналізі контрольних сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення ( $\bar{x}$ ), стандартне відхилення ( $\sigma$ ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2  
Точність в аналізі (нмоль/л)

Взірець	N	$\bar{x}$	$\sigma$	C.V., %
Низький	20	66,97	7,57	11,3
Нормальний	20	131,15	16,86	12,9
Високий	20	268,94	19,29	7,2

ТАБЛИЦЯ 3  
Точність між аналізами (нмоль/л)

Взірець	N	$\bar{x}$	$\sigma$	C.V., %
Низький	10	72.76	11.52	15.8
Нормальний	10	120.76	12.11	10.0
Високий	10	227.69	22.74	10.0

### 14.2 Чутливість

Чутливість (межа виявлення) оцінюється при визначенні варіабельності 0 нмоль/л калібратора сироватки і з використанням  $2\sigma$  (95% точності) для розрахунку мінімальної дози. Дана система має чутливість 28.6 нмоль/л.

### 14.3 Точність

Тест-систему ІФА N-TBG AccuBind® порівнювали з референтним методом. Були використані зразки в діапазоні від 49 нмоль/л до 200 нмоль/л). Загальна кількість досліджених зразків 87. Отримані дані представлені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	118.6	$Y = 1.01(X) - 4.35$	0.999
Метод порівняння	121.18		

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

Перехресна реактивність антитіл, використовуваних для AccuBind® ELISA N-TBG, на вибрані речовини оцінювалася шляхом додавання величезної кількості додаткових речовин в матрицю сироватки. Перехресна реактивність була обчислена шляхом виведення співвідношення між дозами речовини і дозою тироксину, необхідних для витіснення ієї ж кількості кон'югату.

Substance	Cross Reactivity
Bilirubin	ND
Lipids	ND
Triglycerides	ND
Human IgG	ND



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

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 [www.monobind.com](http://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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

