



**IMMUNOASSAYS AND SERVICES**

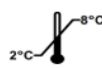
BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

## Інструкція з використання Вільний Т4 ІФА 2 покоління

**REF**

**TF E-2200**



**IVD**

**CE**

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com. www.novamedline.com

## **Використання за призначенням**

Для прямого кількісного визначення вільного тироксину методом імуноферментного аналізу в сироватці людини. Тільки для *in vitro* діагностики.

## **ПРИНЦИП АНАЛІЗУ**

Принцип наступного імуноферментного аналізу наслідує типовий конкурентний сценарій зв'язування. Конкуренція відбувається між неміченим антигеном (присутній у стандартах, контролях та зразках пацієнтів) і міченим ферментом антигеном(кон'югат) для обмеженої кількості сайтів зв'язування антитіл на мікропланшеті.

Процедури промивання та декантації видаляють незв'язані матеріали. Після етапу промивання субстрат ферменту додається. Ферментативну реакцію припиняють додаванням стоп-розчину. Вимірюють поглинання на рідері мікротитрувального планшета. Інтенсивність сформованого кольору обернено пропорційна концентрації вільного T4 у зразку. Набір стандартів використовується для побудови стандартної кривої, з якої кількість вільного T4 в зразках пацієнта і контролях може бути безпосередньо зчитана.

Мічений T4 (кон'югат), використовуваний у цій системі аналізу, не виявив зв'язуючих властивостей щодо зв'язування з тироксин - зв'язуючим глобуліном (TBG) і людським сироватковим альбуміном (HSA). Сайти зв'язування на мікропланшетах призначені для того, щоб мати низьку зв'язуючу здатність, щоб не порушувати рівновагу між T4 і його несучими білками. Випробування проводять при нормальних фізіологічних умовах рН, температурі і йонній сили.

## **КЛІНІЧНІ ЗАСТОСУВАННЯ**

Тироксин (T4), головний тиреоїдний гормон, циркулює в крові майже повністю пов'язаний з білками-носіями. Однак біологічно активною вважається лише вільна (незв'язана) фракція тироксину. Основні носії тироксину – тироксин - зв'язуючий глобулін (TBG), пре-альбумін і альбумін. Вимірювані рівні вільного тироксину (fT4) краще корелюють з клінічним статусом, ніж рівень загального тироксину.

Аналіз вільного T4 є одностадійною конкурентною системою ІФА, яка є швидкою і легко виконаною порівняно з методами рівноважного діалізу і ультрафільтрації, які є громіздкими і трудомісткими. Ця система використовує високоспецифічне моноклональне антитіло і безаналогове мічене, який було доведено експериментально немає значущого зв'язування з TBG і альбуміном.

У еутиреоїдній нормальної популяції концентрація вільного T4 становить 7-22 пг / мл. Рівень вільного T4 зменшується при гіпотиреозі при тиреотоксичних хворих рівень вільного T4 збільшується.

Цей аналіз використовують іноді з іншими тестами щитовидної залози для діагностики *in vitro* та для оцінки пацієнтів, які отримують лікування щитовидної залози (спостереження)

## **ПРОЦЕДУРНІ ПОПЕРЕДЖЕННЯ І ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

1. Користувачі повинні мати глибоке розуміння цього протоколу для успішного використання цього набору. Надійний прогін забезпечується при виконанні інструкцій.
2. Контролі або сироваткові басейни повинні бути включені в кожен пробіг на високому і низькому рівнях для оцінки достовірності результатів.
3. При використанні води для розведення або відновлення використовуйте дейонізовану або дистильовану воду.
4. Щоб зменшити вплив потенційно шкідливих речовин, слід носити рукавички під час обробки набору реактивів і людських зразків.
5. Всі реагенти і зразки набору повинні бути приведені до кімнатної температури і обережно, але ретельно змішані перед використанням. Уникайте повторного заморожування та відтавання реагентів та зразків.
6. Стандартна крива повинна бути встановлена для кожного циклу.
7. Контроль повинен бути включений до кожного циклу і повинен підпадати під встановлені межі довіри.
8. Неналежа технологічна методика, неточне піпетування, неповне промивання, а також неправильне зберігання реагенту може бути вказано, коли значення аналізу для контролів не відображають встановлені діапазони.
9. При зчитуванні мікропланшетів наявність бульбашок у лунках впливає на оптичну густину (ОГ). Перед виконанням етапу зчитування обережно видаліть будь-які бульбашки.

10. Розчин субстрату (ТМБ) чутливий до світла і при належному зберіганні повинен залишатися безбарвним. Розвиток синього кольору може вказувати на нестабільність або забруднення, в цьому випадку набір не повинен використовуватися.
11. При дозуванні субстрату та стоп - розчину не використовуйте піпетки, в яких потраплять ці рідини в контакт з будь-якими металевими деталями.
12. Щоб запобігти забрудненню реагентів, використовуйте новий наконечник для одноразової піпетки для видачі кожного реагенту, зразку, стандарту і контролю.
13. Не змішуйте різноманітні номери комплекту компонентів у тесті і не використовуйте жодних компонентів за межами терміну придатності, нанесеному на етикетці.
14. Реагенти набору повинні розглядатися як небезпечні відходи і утилізуватися відповідно до національних правил.

#### **ОБМЕЖЕННЯ**

1. Всі реагенти всередині набору калібруються для безпосереднього визначення вільного Т4 в сироватці людини. Комплект не є відкалібрований для визначення вільного Т4 в інших зразках людського або тваринного походження.
2. Не використовуйте сильно гемолізовану, сильно ліпемічну, жовтяничну або неправильно збережену сироватку.
3. Будь-які зразки або контрольні сироватки, що містять азид або тимеросал, не сумісні з цим набором, тому що можливо призводять до помилкових результатів.
4. Читання зразків, що перевищують 100 пг / мл, слід повідомляти як таке, яке не слід розбавляти. Розбавлення буде змінювати існуючу рівновагу і призводити до помилкових результатів.
5. Інтерпретація результатів вільного Т4 може ускладнюватися різноманітними лікарськими засобами, тяжким тиреоїдним захворюванням і деякими рідкісними умовами, такими як сімейна дисальбумінемічна гіпертироксинемія (ФДГ). Для діагностики результати цього аналізу завжди слід використовувати в поєднанні з клінічним обстеженням, історією хвороби та іншими висновками.
6. Деякі особини можуть мати антитіла до білка миші, які можуть втручатися в цей аналіз. Тому, результати від будь-яких пацієнтів, які отримали препарат антитіл миші для діагностики або терапії слід інтерпретувати з обережністю.

#### **ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ**

##### **ПОТЕНЦІЙНИЙ БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНИЙ МАТЕРІАЛ**

Сироватка людини, яка може бути використана при підготовці стандартів і контролів, була випробувана і встановлена не реактивною для поверхневого антигену гепатиту В і також була протестована на наявність антитіл до HCV і вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) і виявилася негативною. Однак жоден метод тестування не може запропонувати повну впевненість, що ВІЛ, вірус гепатиту С і вірус гепатиту В або будь-які інфекційні агенти відсутні. Реагенти слід розглядати як потенційну біологічну небезпеку і обробляти з тими ж заходами, які застосовуються до будь-якого зразка крові.

##### **ХІМІЧНА НЕБЕЗПЕКА**

Уникайте контакту з реагентами, що містять ТМБ, перекис водню та сірчану кислоту. Якщо контактували з будь-яким з них реагентів, промити великою кількістю води. ТМБ є підозрюваним канцерогеном.

##### **ЗАБІР І ЗБЕРЕЖЕННЯ ЗРАЗКУ**

Приблизно 0,1 мл сироватки потрібно для кожного визначення в дублікатах. Зберіть 4–5 мл крові в відповідним чином позначені пробірки і дозволити їй згорнутися. Центрифугують і обережно видаляють сироватковий шар. Зберігати при 4 ° С до 24 годин або при -10 ° С або нижче, якщо аналіз проводиться пізніше. Розглядати всі людські зразки як можливі біологічно небезпечні матеріали і вживати відповідних заходів обережності.

##### **ПОПЕРЕДНЯ ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ**

Цей аналіз є прямою системою; не потрібно попередньої обробки зразків.

## РЕАГЕНТИ ТА ОБЛАДНАННЯ НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ

1. Точні піпетки для дозування 25, 100, 150 і 300 мкл
2. Одноразові наконечники для піпеток
3. Дистильована або дейонізована вода
4. Інкубатор 37 оС
5. Рідер для зчитування мікропланшетів з фільтром, встановленим на 450 нм, і верхньою межею ОГ 3,0 або вище \*(див. етап 11 процедури аналізу).

## РЕАГЕНТИ НАДАНІ

### 1. АА Е-0030 Концентрат буфера для промивання - вимагає приготування Х10

Зміст: Один флакон, що містить буфер з неіонним детергентом і консервант, який не містить ртуті.

Об'єм: 50 мл / флакон

Зберігання: Охолодженим при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Приготування: Розбавте 1:10 у дистильованій або дейонізованій воді перед використанням. Якщо використовується вся пластина, розбавляйте 50 мл промивного буфера концентрують в 450 мл води.

### 2. АА Е-0055 ТМБ субстрат - готовий до використання.

Зміст: Одна пляшка, що містить тетраметилбензидин і перекис водню в буфери, що не містить DMF або DMSO буфері.

Об'єм: 16 мл / флакон

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

### 3. АА Е-0080 Стоп розчин - Готовий до використання.

Зміст: Один флакон, що містить 1М сірчану кислоту.

Об'єм: 6 мл / флакон

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Небезпеки



ідентифікація:

H290 Може бути корозійним для металів.

H314 Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей.

## 4. Стандарти та контролі - готові до використання.

Нижче наведені приблизні концентрації, будь ласка, зверніться до етикеток флаконів для точних концентрацій

Каталожний номер	позначення	стандарт	концентрація	Обсяг/флакон
TF E 2201	STANDART A	Стандарт А	0 пг/мл	0,5 мл
TF E 2202	STANDART B	Стандарт В	2 пг/мл	0,5 мл
TF E 2203	STANDART C	Стандарт С	6 пг/мл	0,5 мл
TF E 2204	STANDART D	Стандарт D	20 пг/мл	0,5 мл
TF E 2205	STANDART E	Стандарт Е	80 пг/мл	0,5 мл
TF E 2251	CONTROL 1	Контроль 1	Дивіться етикетки флакона для очікуваних значень і прийнятного діапазону !	0,5 мл
TF E 2252	CONTROL 2	Контроль 2		0,5 мл

Зміст: вільний Т4 в матриці на основі сироватки людини з консервантом, що не містить ртуті. Готують збагаченням сироватки з певною кількістю Т4.

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців у закритих флаконах або як зазначено на етикетці. Після відкриття стандарти повинні бути використані протягом 14 днів або аліквотовані і зберігатися в замороженому вигляді. Уникайте циклів багаторазового заморожування та відтавання

#### **5. TF E-2213 Буфер аналізу** - готовий до використання.

Зміст: Один флакон, що містить буфер на основі білка з консервантом, що не містить ртуті.

Об'єм: 15 мл / флакон

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

#### **6. TF E-2231 Мишачими анти-вільний Т4 антитілами покритий розбірний мікропланшет** - готовий до використання.

Зміст: Один 96-лунковий (12x8) мікропланшет, покритий моноклональним антитілом, в герметично закритому пакеті з осушувачем.

Зберігання: Охолодженим при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

#### **7. TF E-2240 вільний Т4 - Концентрат кон'югату пероксидази з хрому (HRP) - вимагає Підготовку X50**

Зміст: кон'югат вільний Т4-HRP в буфері на основі білка з не ртутним консервантом .

Об'єм: 300 мкл / флакон

Зберігання: Охолодити при температурі 2-8 оС

Стабільність: 12 місяців або як зазначено на етикетці.

Приготування: Розбавте 1:50 в буфері для аналізу перед використанням (наприклад, 40 мкл HRP в 2 мл буфера для аналізу). Якщо в цілому планшет, який слід використовувати, розбавляють 240 мкл HRP в 12 мл буфера для аналізу. Видаліть все, що залишилося.

#### **ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ**

Попередня обробка зразків: **Немає.**

Всі реактиви повинні досягати кімнатної температури перед використанням. Стандарти, контролі та зразки повинні бути проаналізовані в двох примірниках. Після початку процедури всі кроки повинні бути завершені без перерви.

1. Готують робочі розчини кон'югату вільного Т4-HRP і промивного буфера.

2. Відокремте необхідну кількість смуг. Закрийте пакет і поверніть невикористані смужки в холодильник.

3. Внесіть 25 мкл кожного стандарту, контролю і зразку у відповідні мічені лунки в дублікатах.

4. Внесіть 100 мкл робочого розчину кон'югату в кожную лунку.

*(Ми рекомендуємо використовувати багатоканальну піпетку.)*

5. Обережно струсніть планшет протягом 10 секунд.

6. Інкубуйте планшет при 37оС протягом 1 години.

7. Промити лунки 3 рази по 300 мкл розведеного промивного буфера на лунку і міцно натиснути на поглинаючий папір, щоб переконатися, що вона суха.

*(Рекомендується використання вошера).*

8. Прокачайте по 150 мкл субстрату ТМБ у кожную лунку на певні проміжки часу.

9. Інкубуйте планшет при 37оС протягом 10-15 хвилин

*(або доки стандарт А не досягне темно-синього кольору для бажаної ОГ).*

10. Прокачайте по 50 мкл стоп - розчину, у кожную лунку з такими ж часовими інтервалами, як у кроці 8.

11.Зчитують планшет на рідері мікропланшетів при 450 нм протягом 20 хвилин після додавання стоп-розчину. Якщо ОГ перевищує верхню межу виявлення або якщо фільтр 450 нм недоступний, на фільтр 405 або 415 нм можна замінити. Оптична густина буде нижчою, однак це не вплине на результати зразків пацієнта / контролів.

## РОЗРАХУНОК

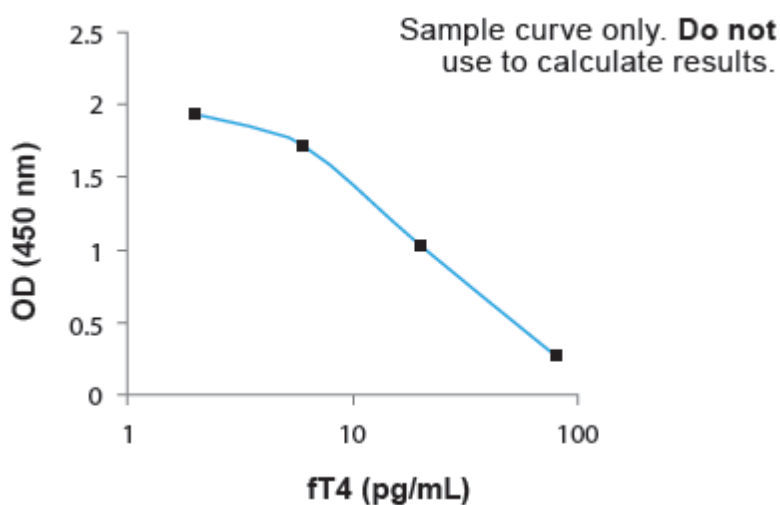
1. Розрахувати середню оптичну густина кожного стандартного дублікату.
2. Намалюйте стандартну криву на напівлогарифмічному папері з середньою оптичною густиною по осі Y і стандарту концентрації на осі X. Якщо використовується програмне забезпечення імунологічного аналізу, крива 4-параметрів або 5 параметрів рекомендується.
3. Розрахувати середню оптичну густина кожного невідомого дублікату.
4. Зчитуйте значення невідомих безпосередньо від стандартної кривої.

## ТИПОВІ ТАБЛИЧНІ ДАНІ

Тільки зразкові дані. Не використовуйте для розрахунку результатів.

стандарт	ОГ1	ОГ2	Значення ОГ	Обсяг (пг/мл)
A	2,043	2,094	2,068	0
B	1,886	1,973	1,929	2
C	1,709	1,727	1,718	6
D	1,032	1,049	1,041	20
E	0,266	0,283	0,274	80
невідомий	1,332	1,312	1,322	13,0

## Типова стандартна крива



## ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

### Чутливість

Нижня межа виявлення розраховується з стандартної кривої шляхом визначення отриманої концентрації середньої ОГ стандарту A (на основі 10 повторних аналізів) мінус 2 СВ. Тому чутливість Прямий набір вільного T4 ІФА становить 1,0 пг / мл.

### СПЕЦИФІЧНІСТЬ (Перехресна реактивність)

Наступні з'єднання тестували на перехресну реактивність з набором ІФА прямих вільний Т4 з перехресною реакцією Т4 при 100%.

з'єднання	% перехресної реактивності
L- тироксин	100
D-тироксин	94
3,3',5'-трийодо-L – тиронін (реверсивний Т3)	86
3,3',5'-трийодо-L – тиронін ( Т3)	3,3
3,3',5'-трийодо-D–тиронін	1,8
3,3',5'-трийодтиропропіонічна кислота	0,6

Наступні сполуки тестували, але перехресно реагували менш ніж 0,04%: ацетилсаліцилову кислоту, 3,5-дійодо-Т-тиронін, 3,5-Діодо-L-тирозин і 3-йодо-L-тирозин.

### ТОЧНІСТЬ ВНУТРІШНЬОАНАЛІТИЧНА

Три зразка аналізували десять разів на одній стандартній кривій. Результати (в пг / мл) наведені в таблиці нижче

зразок	середнє	СВ	CV %
1	3,79	0,16	4,8
2	23,26	1,14	4,9
3	70,60	3,04	4,3

### Точність між аналізами

Три зразка аналізували десять разів протягом чотирьох тижнів. Результати (в пг/мл) наведені в таблиці нижче :

зразок	середнє	СВ	CV %
1	4,27	0,53	12,3
2	20,54	2,36	11,5
3	67,34	6,67	9,9

### ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Що стосується всіх клінічних досліджень, кожна лабораторія повинна збирати дані та встановлювати власний діапазон очікуваних нормальних значень. Наступний референтний діапазон (пг / мл) був встановлений у 80 очевидно здорових дорослих

група	кількість	Діапазон (пг/мл)
Нормальні еутиреоїдні зразки	80	7-22

### ВПЛИВ БІЛІРУБІНА

Білірубін додавали до зразка пацієнта в концентраціях 50 і 100 мкг / мл і аналізували за допомогою прямого вільного Т4 Набору ELISA. Результати наведені нижче:

зразок	Вільний Т4 (пг/мл)
Незбагачений	8,78
+50 мкг/мл білірубін	10,68
+100 мкг/мл білірубін	9,72

### ВПЛИВ АЛЬБУМІНУ СИРОВАТКИ ЛЮДИНИ (HSA)

Очищений сироватковий альбумін людини (HSA) додавали до зразка пацієнта в концентраціях 10, 20 і 40 мг / мл. Зразки аналізували за допомогою набору ELISA прямих вільний Т4. Результати наведені нижче:

зразок	Вільний Т4 (пг/мл)
незбагачений	8,78
+10 мг/мл	8,81
+20 мг/мл	9,46
+40 мг/мл	9,90

У цих концентраціях не було виявлено зв'язування міченого вільного Т4 з сироватковим альбуміном людини.

### **ВПЛИВ ТИРОКСИН - зв'язуючого ГЛОБУЛІНУ (ТВГ)**

Стандарт А був збагачений точно очищеним ТЗГ в концентраціях від 25-200 мкг / мл і аналізований за допомогою набору ELISA прямий вільний Т4. Результати наведені нижче:

<b>зразок</b>	<b>Тироксин зв'язуючий глобулін (мкг/мл)</b>	<b>ОГ 450 нм</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1,883</b>
<b>2</b>	<b>25</b>	<b>2,030</b>
<b>3</b>	<b>50</b>	<b>2,149</b>
<b>4</b>	<b>100</b>	<b>2,175</b>
<b>5</b>	<b>200</b>	<b>2,251</b>

Не було виявлено значного зв'язування міченого вільного Т4 з ТВГ при цих концентраціях.

### **ВПЛИВ НЕ-ЕТЕРИФІКОВАНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ**

Олеїнову кислоту додавали до зразка пацієнта при концентраціях 0,5, 5 і 20 ммоль / л і аналізували з прямим вільним Т4 Набір для ELISA. Результати наведені нижче:

<b>зразок</b>	<b>Вільний Т4 (пг/мл)</b>
незбагачений	24,83
+0,5 ммоль/л	20,53
+5 ммоль/л	26,06
+20 ммоль/л	83,64

При високих концентраціях олеїнової кислоти рівень Т4 був значно підвищений. Це пов'язано з відомим ефектом, що неетерифіковані жирні кислоти можуть дисоціювати Т4 від його білків-носіїв.



## ЛІТЕРАТУРА

1. Ingbar SH, et al. *J Clin Invest.* 1965; 44(10):1679–89.
2. Robbins J. *Metabolism.* 1973; 22(8):1021–6.
3. Schall RF Jr., et al. *Clin Chem.* 1978; 24(10):1801–4.
4. Selenkow HA, Robin NI. *J Maine Med Assoc.* 1970; 61:199–211.
5. Oppenheimer JH, et al. *J Clin Invest.* 1963; 42:1769–82.
6. Young DS, et al. *Clin Chem.* 1975; 21(5):1D–432D.
7. Sterling K, Hegedus J. *J Clin Invest.* 1962; 41: 1031–40.
8. Cavalieri RR, et al. *Clin Res.* 1967; 15:124.
9. Comoglio S, Celada F. *J Immunol Methods.* 1976; 10(2–3):161–70.
10. McComb RB, Bowers GN, Posen S. In: *Alkaline Phosphatase*, 1st Ed. New York: Plenum Press; 1979: 525–704.

### Умовні позначення :

 Температура зберігання	 Виробник	 Містить достатньо <N> випробувань
 Дата закінчення терміну придатності	<b>LOT</b> Код партії	<b>IVD</b> Тільки для ін вітро діагностики в лабораторних умовах!
 Зверніться до інструкції з використання	<b>CONT</b> Зміст	<b>CE</b> Маркування
Небезпека	REF Каталожний номер	RUO тільки для дослідницьких цілей