

# НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНОГО ТИРОКСИНУ (fT4)

## 1225-300, Free Thyroxine (fT4) Test System

Каталог. №: 1225-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 06-07-2012

Версія 3



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

### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Тест призначений для кількісного визначення концентрації вільного тироксину в людській сироватці або плазмі.

### 2. ВСТУП

Тироксин - важливий тиреоїдний гормон, циркулює в крові в основному у зв'язаному білками-переносниками вигляді. Основним з них є тироксин-зв'язуючий глобулін (ТЗГ). Однак, тільки вільна (незв'язана) частина тироксину відповідальна за біологічну активність. Концентрації білків-переносників змінюються при багатьох клінічних станах, таких, наприклад, як вагітність. При нормальній тиреоїдній функції при зміні концентрації білків-переносників рівень загального тироксину змінюється, а рівень вільного тироксину залишається постійним. Таким чином, рівні вільного тироксину краще корелюють з клінічним статусом, ніж рівні загального тироксину. Наприклад, можливе підвищення загального тироксину вище нормальних значень, пов'язане з вагітністю, прийомом оральних контрацептивів і естрогенів, в той же час рівні вільного тироксину залишаються в діапазоні норми. Маскування патологічної тиреоїдної функції може також зустрічатися при станах гіпер- і гіпотиреозу при зміні в концентрації тироксин-зв'язуючого глобуліну (ТЗГ). Загальний Т4 може бути підвищений або знижений при зміні ТЗГ таким чином, що залишається в нормальному діапазоні. У цій ситуації концентрація вільного Т4 більш адекватно відображає клінічний статус пацієнта.

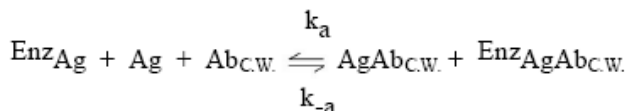
Методологія ІФА забезпечує клініцистів оптимальною чутливістю при мінімумі необхідних технічних маніпуляцій. У цьому методі в мікролунок додаються спочатку стандартні сироватки, зразки пацієнта або контролю. Потім додається ферментний кон'югат Т4, і реакційна суміш перемішується. Відбувається конкурентна реакція між ферментним кон'югатом і вільним тироксином за обмежене число антитіл, іммобілізованих в лунках мікропланшетів.

Після завершення необхідного інкубаційного періоду антитіла, які зв'язали ферментний Т4 кон'югат, відокремлюються від незв'язаних кон'югата промиванням. Активність ферменту на поверхні осередків вимірюється реакцією з відповідним субстратом. Використання стандартів fT4 з відомими різними концентраціями дозволяє побудувати калібрувальну криву. Концентрації fT4 в невідомих зразках визначаються за цією калібрувальною кривою.

### 3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Конкурентний імуоферментний аналіз (тип 5)

Реагенти, що вимагаються для твердофазного імуоферментного аналізу, включають іммобілізовані антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген. У процесі аналізу при взаємодії осередків, покритих антитілами, кон'югату фермент-антиген і нативного антигену, що міститься в сироватці, відбувається конкуренція між антигеном зразка і кон'югатом фермент-антиген за обмежене число іммобілізованих сторін зв'язування. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{c.w.}$  = Моноспецифічні іммобілізовані антитіла (постійна кількість)

$\text{Ag}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAg}$  = Кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

$\text{AgAb}_{c.w.}$  = Комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAg Ab}_{c.w.}$  = Комплекс кон'югат - антитіла

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_a$  = константа швидкості дисоціації

$K = k_a / k_a$  = константа рівноваги

Після досягнення рівноваги пов'язана з іммобілізованими антитілами фракція відділяється від незв'язаних антигенів декантацією або аспірацією. 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. Референсна людська сироватка – 1 мл у флаконі

Шість флаконів референсної сироватки (Калібраторів) з концентраціями fT4 приблизно\* O (A), 0.4 (B), 1.25 (C), 2.10 (D), 5.00 (E) і 7.40 (F) нг / дл. Зберігати при 2-8 ° С. Містять консервант. Для переведення одиниць: 1 нг/дл x 12,9 = пмоль/л

\*Точні концентрації, що залежать від лота, наведені на етикетках флаконів.

#### B. Ферментний реагент fT4 – 13 мл у флаконі

Один флакон, що містить кон'югат тироксину з пероксидазою хрому в розчині протеїн - стабілізуючої матриці. Містить консервант. Зберігати при 2-8 ° С.

#### C. Планшет, покритий антитілом fT4 – 96 лунок

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий анти-T4 сироваткою і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 ° С.

#### D. Концентрат розчину для промивання – 20 мл

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-30 ° С.

#### E. Субстрат А – 7 мл у флаконі

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

#### F. Субстрат В – 7 мл у флаконі

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

#### G. Стоп-розчин – 8.0 мл у флаконі

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-30 ° С.

#### H. Інструкція

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

**Зауваження 2:** Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

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

1. Мікродозатори на 50 і 100 мкл з точністю вищою 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гіршою 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер.
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Посудини для приготування Робочого субстратного розчину і промивального буфера.
6. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
7. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
8. Таймер
9. Контрольні матеріали.

#### 5. 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, 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 Publication No. (CDC) 88-8395.

## 6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

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

Зразки можуть зберігатися при 2-8°C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20°C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях потрібно 0.100 мл сироватки.

## 7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю з рівнями гіпо-, гіпер і еутиреоїдного діапазонів для відстеження характеристик набору. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що постачаються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або розкладанні реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Розчин для промивання

Вилийте вміст концентрату розчину для промивання в посудину об'ємом 1000 мл. Розбавте до 1000 мл дистильованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (20-30°C) до 60 днів.

### 2. Робочий субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст коричневого флакона з Субстратом А у флакон з Субстратом В. Закрийте суміш жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть флакон «Робочий розчин субстрату». Розчин зберігається при 2-8°C.

**Зауваження 1: не використовуйте робочий розчин субстрату, 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).

- Виберіть необхідну кількість лункок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8°C.**
- Додайте піпеткою по 50 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків в відповідні лунки.
- Додайте піпеткою по 100 мкл розчину fT4 ферментного реагенту в кожну лунку.
- Добре перемишайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його пластиковою плівкою.
- Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лункок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальної папері, якщо використовувалася декантація.
- 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 чи ручного вошер відповідно до інструкцій виробника приладів (уникайте повітряних бульбашок).**
- Додайте піпеткою по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. "Приготування реагентів"). **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути розбіжностей в часі реакції в різних лунках.**

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хв. при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну клітинку 50 мкл стоп-розчину і перемишайте осередку 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.**
- Виміряйте величини поглинання вмісту осередків 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.**

## 10. РЕЗУЛЬТАТИ

**Для визначення концентрації tT4 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.**

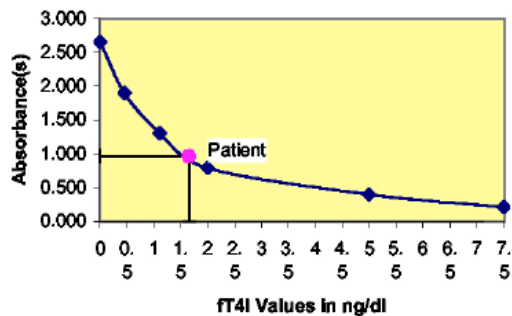
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх осередків як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації tT4 в нг/дл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте невідомі концентрації fT4 в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція (0.964) перетинає стандартну криву при 1.65 нг/дл (див. мал.1).

Приклад 1

Взорець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (нг/дл)
Калібратор А	A1	2.658	2.612	0.00
	B1	2.566		
Калібратор В	C1	1.919	1.900	0.45
	D1	1.880		
Калібратор С	E1	1.339	1.306	1.10
	F1	1.273		
Калібратор D	G1	0.769	0.790	2.00
	H1	0.811		
Калібратор E	A2	0.396	0.400	5.00
	B2	0.404		
Калібратор F	C2	0.215	0.217	7.40
	D2	0.219		
Контроль 1	E2	1.827	1.835	0.50
	F2	1.843		
Контроль 2	G2	0.541	0.557	2.70
	H2	0.573		
Пацієнт	A3	0.951	0.964	1.65
	B3	0.976		

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

Малюнок 1



## 11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

- Оптична щільність калібратора 0 нг/дл > 1.3.
- Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12. ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

### 12.1 . Якість набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- 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 лункок (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.

## 12.2 Інтерпретація результатів

Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховуються значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

- Для аналізу не повинні використовуватися високо ліпімічні, гемолізовані або контаміновані зразки.
- Якщо значення проби пацієнта вище, ніж значення вищого калібратора (наприклад, > 7,4 нг / дл) Не намагайтеся розводити проби. Варіації ТСГ в різних матриксах не дозволяють проводити серійне розведення fT4.
- Концентрація fT4 в сироватці залежить від безлічі факторів: функція щитовидної залози та її регуляція, концентрація ТСГ і зв'язування тироксину з ТСГ. Таким чином, визначення однієї лише концентрації fT4 не є достатнім для оцінки клінічного статусу.
- Рівні загального Т4 можуть бути підвищені при вагітності, прийомі оральних контрацептивів.
- Зниження концентрації загального Т4 спостерігається при хворобах, пов'язаних з втратою білка, захворюванням печінки, прийомом тестостерону, дифенілгідантоїну або саліцилатів. Відомості про інтерференції різних ліків і умовах, що впливають на вміст загального тироксину ви можете знайти в спеціальних виданнях з лабораторної діагностики.
- Інтерпретація результатів визначення fT4 ускладнюється також різними лікарськими засобами, які можуть впливати на зв'язування Т4 з тиреоїдтранспортними білками або впливають на його метаболізм. При важких нетиреоїдних захворюваннях (NTI) оцінка тиреоїдної функції представляє особливу важкість, оскільки пацієнти цієї категорії можуть страждати від супутнього первинного гіпотиреоїдизму або від компенсаторного вторинного гіпотиреоїдизму. У таких випадках можна порекомендувати чутливі методи визначення ТТГ.
- У рідкісних випадках, асоційованих із значними варіаціями в альбумін-зв'язує здібності Т4, - таких, як спадкова дісальбумінемічна гіпертіроксінемія (FDH) - пряме визначення Т4 може призводити до помилкових висновків.
- На визначення можуть вплинути циркулюючі антитіла до Т4 та інгібітори зв'язування гормону.
- Показано, що гепарин впливає на рівень Т4 in vivo і in vitro. Зразки пацієнтів, які проходять гепаринову терапію, повинні відбиратися перед введенням антикоагулянту.

## НАБІР НЕ ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ СКРИНІНГУ НОВОНАРОДЖЕНИХ

## 13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Було проведено дослідження дорослої еутиреоїдної популяції цим набором і отримані наступні результати:

**ТАБЛИЦЯ 1**  
Очікувані значення для Т4 в нг/дл

	Дорослі	Вагітні
<b>Кількість взірців</b>	89	31
<b>Середнє (X)</b>	1.40	1.50
<b>Стандартне відхилення (δ)</b>	0.30	0.37
<b>Очікувані діапазони (± 2δ)</b>	0.8-2.0	0.76-2.24

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

## 14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

### 14.1 Точність

Точність набору fT4 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 (нг/мл)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
<b>Низький</b>	20	0.550	0.061	10.98
<b>Середній</b>	20	1.740	0.074	4.26

<b>Високий</b>	20	3.250	0.106	3.25
----------------	----	-------	-------	------

**ТАБЛИЦЯ 3**  
Точність між аналізами (нг/мл)

Взірець	N	x	δ	C.V., %
<b>Низький</b>	10	0.480	0.052	10.81
<b>Середній</b>	10	1.410	0.085	6.01
<b>Високий</b>	10	3.490	0.279	7.90

### 14.2 Чутливість

Метод має чутливість 0,314 нг/дл. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (нг/дл) плюс 2σ (стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

### 14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним радіоімунним методом. Використовувалися зразки гіпотиреоїдних, еутиреоїдних і гіпертиреоїдних пацієнтів (діапазон значень від 0,1 до 8 нг/дл). Загальне число зразків було 197. Було виведено рівняння регресії і розрахований коефіцієнт кореляції для fT4 IFA у порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

**ТАБЛИЦЯ 4**  
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
<b>Monobind EIA "X"</b>	1.56	$y = 0.1034 + 0.9525x$	0.920
<b>Predicate RIA "Y"</b>	1.59		

Була визначена тільки незначна розбіжність даного методу та референс-методу, що доводить близькість середніх значень. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

### 14.4 Специфічність

Вплив перехресних речовин оцінювався при додаванні значної кількості речовин в різних концентраціях до сироватки. Крос-реактивність розраховували як співвідношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою трийодтироніну, необхідного для реакції з однаковою кількістю трейсера.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
<b>I-Тироксин</b>	1.0000	-
<b>d-Тироксин</b>	0.9800	10 мкг/дл
<b>d-Трийодтиронин</b>	0.0150	100 мкг/дл
<b>I-трийодтиронин</b>	0.0300	100 мкг/дл
<b>Йодотирозин</b>	0.0001	100 мкг/мл
<b>Дийодотирозин</b>	0.0001	100 мкг/мл
<b>Дийодотиронін</b>	0.0001	100 мкг/мл
<b>ТСГ</b>	-	40 мкг/мл
<b>Альбумін</b>	-	40 мкг/мл
<b>Фенилбутазон</b>	-	10 мкг/мл
<b>Фенитоїн</b>	-	40 мкг/мл
<b>Саліцилати</b>	-	500 мкг/мл



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)

