

НАБІР РЕАГЕНТІВ ТИРОКСИН (Т4)

T-4 ELISA

Каталог. №: **EIA-1781**

Дата випуску інструкції: **2016-09**
Версія **5.0**



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

Для діагностики in-Vitro
Зберігати при температурі 2 - 8 °С.

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Для кількісного визначення концентрації загального тироксину (Т4) у сироватці людини. Тест корисний в діагностиці та лікуванні захворювань щитовидної залози.

2. ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ

Тиреоїдні гормони тироксин (Т4) та трийодтиронін (Т3) синтезуються і зберігаються у щитовидній залозі і циркулюють у крові, найчастіше пов'язані з ним білком плазми, глобулін зв'язаний з тороксином (ТМГ).¹ Щитовидна залоза та пов'язані з нею гормони є основними компонентами ендокринної системи. Вони надають потужні та важливі регуляторні впливи на ріст, диференціацію, клітинний метаболізм та загальний гормональний баланс тіла.

Протеолітичне розщеплення фолікулярного тиреоглобуліну виділяє Т4 в кровообіг. Більше ніж 99% Т4 назад зв'язується з трьома протеїнами плазми в крові - тироксин пов'язаний глобулін (ТБГ) пов'язує 70%, тироксин пов'язаний пре-альбумін (ТВРА) пов'язує 20%, альбумін зв'язує 10%. Близько 0,03% Т4 залишаються вільними (статус незв'язаний) у крові завжди.

Хвороби, викликані тиреоїдною функцією, можуть давати безліч різних симптомів¹. Вимірювання загального Т4, ТSH, Т3 вільного Т4 вільного за допомогою імуноаналізу найбільш точний і зручний тест, який дає можливість визначити присутність тиреоїдної невідповідності у пацієнтів.^{4,5} Збільшені рівні Т4 проявляються при гіпертиреозидизмі під час хвороби Грейвса і хвороби Пламера і під час гострого тиреоїдиту. Низькі рівні Т4 асоціюються з вродженим гіпотиреоїдизмом, мікседемі, хронічному тиреоїдиті (хвороби Хашимото) і з деякими генетичними аномаліями.

3. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Щоб виміряти Т4 за допомогою конкурентних способів, зразок сироватки або плазми, який містить Т4, що потрібно визначити кількісно, змішується з поміченим Т4 та Т4 антитілом.^{6,7} Позначений Т4 містить 8-аніліно-1-нафталінсульфонову кислоту (ANS), щоб інгібувати зв'язування Т4 з білками сироватки, що в іншому випадку буде перешкоджати аналізу. Під час інкубації фіксована кількість позначених Т4 конкурує з позначеними Т4 у зразку, стандарті або сироватці контролю якості для фіксованого числа ділянок зв'язування на специфічному антитілі Т4.

Відокремлення незв'язаного Т4 від зв'язаного з антитілом Т4 та подальшого вимірювання позначеної фракції зв'язаної фази завершує тестування. Порівнюючи результати невідомого зразка з результатами, отриманими з серії калібраторів Т4, можна отримати точне вимірювання концентрації Т4 у зразку.

У Т4 ELISA (EIA-1781), антитіло до Т4 покриті на твердій фазі (мікротитрова лунка). Виміряна кількість сироватки пацієнта і постійна кількість Т4 позначеного кон'югованого з пероксидазою хрому додаються в лунки. Під час інкубації, Т4 у зразку пацієнта та ферментно позначений Т4 конкурують за місця обмеженого зв'язування з Т4 антитілом. Через 60 хвилин інкубації при кімнатній температурі лунки промивають водою 5 разів для видалення не зв'язаного Т4. В лунки додають розчин ТМБ (тетраметилбензидин) і інкубують протягом 20 хвилин, в результаті чого, розвивається блакитне забарвлення. Реакцію зупиняють додавши 1N HCL, і отриманий жовтий вимірний спектрометрично при 450 нм. Інтенсивність утвореного забарвлення обернено-пропорційна кількості Т4 у зразку пацієнта. З посиланням на серію калібраторів, оброблених таким самим способом, визначають концентрацію Т4 у невідомому зразку.

4. НЕОБХІДНІ РЕАГЕНТИ ТА ОБЛАДНАННЯ

1. **Лунки, покриті антитілами** (1 планшет, 96 лунок)
Мікротитрові лунки покриті овечим анти-Т4.
2. **Концентрат ферментного кон'юганту** 11X (1.3 мл)
Містить Т4-HRP кон'югант
3. **Розріджувач ферментного кон'юганта** (1 пляшка, 13 мл)
Містить ANS, Трис-буфер, pH=7.60 та ProClin 300.
4. Референтний набір **Стандартів** 0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0 і 25.0 мкг/дл у Т3/Т4 вільному людській сироватки
1 набір, рідина, готова до використання
5. **ТМВ Реагент** (1 пляшка, 11 мл)
Містить 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМВ) стабілізований у розчин буферу.
6. **Стоп-Розчин** (1N HCl), (1 пляшка, 11 мл)
Містить розбавлену соляну кислоту.

5. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Дистильована або деіонізована вода.
2. Прецесійні піпетки: 25 мкл, 100 мкл, 200 мкл і 1 мл.
3. Наконечники для піпеток.
4. Зчитувач для мікротитрових лунок при 450 нм.
5. Абсорбуючий папір.
6. Папір для побудови графіків.
7. Вихровий змішувач або аналог.
8. Контрольний матеріал (напр. BioRad Lyphochek контрольна сироватка)

6. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. **УВАГА:** Цей набір містить людський матеріал. Вихідний матеріал, який використовується для виробництва цього набору, показав негативні результати для HBsAg, ВІЛ 1/2 і HCV на FDA-схвалених методів. Проте, жоден метод не може повністю гарантувати відсутність цих агентів. Таким чином, всі продукти крові людини, в тому числі зразки сироватки, повинні бути розглянуті як потенційно інфекційні. Обробка та утилізація слід проводити, відповідно до місцевих правил національної біологічної безпеки або регулювань.
2. Не використовувати реагенти після закінчення терміну придатності і не змішуйте компоненти різних наборів.
3. Не використовуйте реагент, коли вона стає мутним, або підозрюється забруднення.
4. Не слід використовувати реагент, якщо флакон пошкоджений.
5. Закрити реагенти кришками негайно. Не міняйте кришки.
6. Кожну лунку використовувати тільки один раз.
7. Не набирати реагенти ротом.
8. Розчини, що містять добавки або консерванти, такі як азид натрію, не слід використовувати в ферментативній реакції.
9. Уникати контакту з 1 N HCl. Це може викликати подразнення шкіри та опіки. У разі попадання на шкіру, промийте великою кількістю води та зверніться до лікаря, якщо подразнення не проходить.
10. Для діагностичного використання в пробірці.

7. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

1. Закритий набір слід зберігати при температурі 2-8 °С, якщо він не використовується - до закінчення терміну придатності вказаного на етикетці набору. Термін придатності набору може подивитись на етикетці набору.
2. Відкритий набір та використані реагенти стабільні до закінчення терміну придатності, за умови зберігання при температурі від 2 -8°C.
3. Зберігайте мікротитровий планшет в герметичній упаковці з осушувачем, щоб мінімізувати вплив вологого повітря.

8. ІНСТРУМЕНТАРІЙ

Придатним для використання є Мікропланшетний зчитувач з шириною смуги 10 нм або менше і оптичною щільністю в діапазоні від 0-2 ОЩ або вище при довжині хвилі 450 нм.

9. ЗБІР І ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

1. Можуть використовуватися зразки сироватки. Забір крові проводиться з використанням стандартних методів венепункції, а сироватку слід відокремити від червоних кров'яних тілець якомога швидше. Уникати сильно гемолітичних, ліпемічних або каламутних зразків.
2. Зразки плазми, взяті в пробірках, що містять ЕДТК, гепарин або оксалат, можуть впливати на процедуру тесту.
3. Зразки зберігати до 48 годин при 2-8 °С перед проведенням аналізу. Зразки, які зберігаються до 6 місяців, необхідно заморозити тільки раз при -20 °С перед тестуванням. Розморожені зразки інвертувати декілька разів перед тестуванням.

10. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Перед використанням приведіть реагенти до кімнатної температури (18-25 °C), струсіть та інвертуйте не утворюючи піну.
2. Для приготування **кон'юганту Робочого Т4-HRPO реагенту**: додайте 0.1 мл Т4-HRPO Концентрату кон'юганту (11х) до 1.0 мл розчинника кон'юганту Т4 (1:10 розведення) і добре змішайте. Кількість розведеного кон'юганту залежить від об'єму аналізу. **Робочий Реагент кон'юганта стабільний при температурі 4°C протягом 24 годин.**

11. ПРОЦЕДУРНІ ПРИМІТКИ

1. Ручне піпетування: рекомендується використовувати не більше 32 лунок для кожного аналізу. Піпетування усіх стандартів, зразків та контролів повинно завершитися протягом 3 хвилин. Рекомендується використовувати багатоканальну піпетку.
2. Автоматичне піпетування: Для кожного аналізу, потрібно використовувати повний планшет з 96 пробірок. Проте, рекомендується, щоб піпетування всіх стандартів, зразків та контролів завершилося через 3 хвилини.
3. Всі стандарти, зразки та контролі повинні тестуватися в двох примірниках, щоб усі умови тестування були однакові.
4. Рекомендується, щоб усі лунки зчитувалися протягом 15 хвилин з додаванням Стоп розчину.

12. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Помістіть потрібну кількість покритих лунок у тримач.
2. Внесіть **25 мкл стандартів, зразків і контролів** у відповідні лунки.
3. Додайте **100 мкл Реагенту Робочого Кон'юганту** у кожну лунку.
4. Ретельно перемішайте вміст лунок на протязі 30 секунд.
5. Інкубуйте при кімнатній температурі (18-25 °C) протягом 60 хв.
6. Видаліть вміст лунок.
7. Промити лунки дистильованою водою 5 разів.
8. Переверніть лунки на абсорбуючий папір або паперовий рушник для видалення залишків рідини.
9. Внесіть **100 мкл реагенту ТМБ** в кожну лунку. Акратно перемішайте протягом 5 секунд.
10. Інкубуйте при кімнатній температурі в темному місці протягом 20 хвилин.
11. Зупиніть реакцію, додавши **100 мкл Стоп-Розчину** у кожну лунку.
12. Акратно перемішайте протягом 30 секунд. **Переконайтеся, що весь синій колір змінився на жовтий.**
13. Виміряйте оптичну щільність лунок при 450 нм **протягом 15 хв.**

13. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Розрахувати середні значення поглинання (ОЩ 450 нм) з дублікатів набору референтних стандартів, контролів і зразків.
2. На папері для графіків побудуйте стандартну криву, відкладаючи на вертикальній осі (Y) значення поглинання для кожного стандарту, а на горизонтальній осі (X) значення концентрації.
3. За допомогою середніх значень поглинання для кожного зразка за калібрувальною кривою визначіть відповідну концентрацію Т4 в мкг/дл. Залежно від досвіду та/або наявності можливостей комп'ютера, можуть використовуватися інші способи зменшення даних.
4. Всі розведені взірці мають бути відкоректовані з відповідним коефіцієнтом розведення.

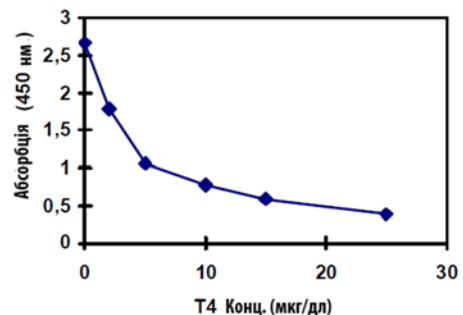
13.1 Калібрування аналізу

Стандарти Т4 відкалібровані відповідно до тесту загальний Т4 Coat-A-Count RIA корпорації Diagnostic Products. Точність цього калібрування становить 100 ± 5%. Таким чином, точність зразків пацієнтів, що пройшли тестування із Загальним Т4 ELISA (EIA-1781), може варіюватися на ± 5%.

13.2 Приклад калібрувальної кривої

Нижче наведені результати типового стандартного аналізу з показаннями оптичної щільності при 450 нм, показані на осі Y до концентрацій загального Т4 (мкг/дл), представлених на осі X. **ПРИМІТКА:** Стандартна крива представлена тільки для ілюстрації і не повинна використовуватися для розрахунку невідомого. Кожна лабораторія повинна надати свої дані та стандартну криву для кожного аналізу. Крім того, значення поглинання (450 нм) можна змінювати через інкубацію при різних температурах у різних лабораторіях.

Загальний Т4 (мкг/дл)	Абсорбція (450 нм)
0	2.667
2	1.786
5	1.060
10	0.778
15	0.591
25	0.384



14. ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Т4 ELISA (EIA-1781) використаний при дослідженні 200 зразків пацієнтів з еутиреозом (як визначено стаціонарним лабораторним аналізом) в одному географічному положенні та давав нормальний діапазон від 5.0 до 13.0 мкг / дл.

Діапазон був визначений отриманими значеннями та відповідає тим, що запропонували виробники.

Лабораторіям рекомендується коригувати значення, щоб відобразити географічні та демографічні відмінності.

15. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Лабораторна практика вимагає, щоб контрольні зразки(контролі) низької, середньої та високої якості були запущені з кожною калібрувальною кривою для перевірки ефективності аналізу. Для забезпечення належного виконання, статистично значну кількість контролів потрібно проаналізувати, щоб встановити середні значення і прийнятні діапазони. Контролі, які містять азид натрію, не повинні використовуватися.

16. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

16.1 Точність

Статистичне дослідження з використанням 82 зразків пацієнтів (діапазон = 1.3-24.5 мкг/дл), показали хорошу кореляцію результатів з набором Abbott's AxSym Загального Т4:

K-сть = 82

Коефіцієнт кореляції = 0.954

Нахил = 0.914

Затримка = 1.049

EIA-1781 Середнє значення = 9.9 мкг/дл

Abbott AxSym Середнє значення = 10.1 мкг/дл

Інше дослідження з використанням 107 зразків пацієнтів (діапазон = 2.2 – 29.7 мкг/дл) показало хорошу кореляцію результатів з набором Monobind Total T4 EIA, як показано нижче:

K-сть = 107

Коефіцієнт кореляції = 0.978

Нахил = 0.938

Затримка = 0.485

BioCheck Середнє значення = 10.1 мкг/дл

Monobind Середнє значення = 10.0 мкг/дл

16.2 Чутливість

Мінімальна концентрація Т4, яка може бути визначена даним аналізом, становить 0.5 мкг/дл.

16.3 Точність

16.3.1 Точність в аналізі

Точність в аналізі визначалася з повторного визначення трьох різних сироваток контролю в 1 аналізі.

Зразок сироватки	1	2	3
Кількість повторів	26	26	26
Середнє значення Т4 (мкг/дл)	3.95	8.65	20.51
Стандартне відхилення	0.17	0.27	0.80
Коефіцієнт варіації (%)	4.3%	3.1%	3.9%

16.3.2 Точність між аналізами

Точність між аналізами визначалась повторними вимірюваннями трьох різних зразків сироватки в декількох різних аналізах.

Зразок сироватки	1	2	3
Кількість повторів	26	26	26
Середнє значення Т4 (мкг/дл)	4.29	8.71	19.01
Стандартне відхилення	0.19	0.35	0.45
Коефіцієнт варіації (%)	4.5%	4.0%	2.4%

16.4 Відновлення та лінійність досліджень

16.4.1 Відновлення

Різні сироватки зразків пацієнтів з відомими рівнями Т4 були об'єднані і проаналізовані у двох примірниках. Відновлення склало 96.7%.

Очікувана концентрація(мкг/дл)	Отримана концентрація (мкг/дл)	% Відновлення
19,49	20,06	102,9%
8,36	6,98	83,5%
6,17	6,20	100,5%
4,11	3,58	87,1%
3,36	3,67	109,2%
1,66	1,52	91,6%
Середнє відновлення #1 = 95.8%		
21,52	22,04	102,4%
14,85	13,78	92,8%
6,70	6,89	102,8%
1,70	1,56	91,8%
Середнє відновлення #2 = 97.5%		

16.4.2 Лінійність

Два зразки були послідовно розбавлені вільними Т3/Т4 людської сироватки для визначення лінійності. Відновлення було 98,8%.

#	Розведення	Очік. конц. (мкг/дл)	Отрим. Конц. (мкг/дл)	% Очікуваний
1.	Нерозведений	---	15.12	---
	1:2	7.56	7.50	99.2%
	1:4	3.78	3.80	100.5%
	1:8	1.89	1.74	91.9%
В середньому = 97.2%				
2.	Нерозведений	---	16.74	---
	1:2	8.37	8.86	105.7%
	1:4	4.19	4.18	99.8%
	1:8	2.09	1.80	86.0%
В середньому = 100.4%				

16.5 Специфічність

Наступні речовини були протестовані на перехресну реактивність:

ПРОТЕСТОВАНИЙ МАТЕРІАЛ	КОНЦЕНТРАЦІЯ	ІНТЕНСИВНІСТЬ КОЛЬОРУ ЕКВІВАЛЕНТНА до Т4 (мкг/дл)
Л-Тироксин (Т4)	2 мкг/дл	2.22
	4 мкг/дл	3.80
	6 мкг/дл	5.53
	8 мкг/дл	8.79
Д-Тироксин (Т4)	2 мкг/дл	2.61
	4 мкг/дл	4.38
	6 мкг/дл	6.84
	8 мкг/дл	9.13
Трийодо-L-тиронін	0.5 мкг/дл	0.20
	2 мкг/дл	0.47
	4 мкг/дл	0.68
	6 мкг/дл	1.36
Трийодо-D-тиронін	0.5 мкг/дл	0.16
	2 мкг/дл	0.40
	4 мкг/дл	0.60
	6 мкг/дл	1.20
Тіоцтова кислота	8 мкг/дл	1.40
	0.5 мкг/дл	0.00
	2 мкг/дл	0.05
	6 мкг/дл	0.10
	10 мкг/дл	0.25
Моноидтирозин	25 мкг/дл	0.60
	100 мкг/дл	2.90
	1,000 мкг/дл	0.00
	5,000 мкг/дл	0.27
Дийодтирозин	1,000 мкг/дл	0.00

	5,000 мкг/дл	0.00
Метимазол	1,000 мкг/дл	0.00
	50,000 мкг/дл	0.00
	2,000,000 мкг/дл	0.00
5,5'-Дифенілгідантоїн	1,000 мкг/дл	0.00
	50,000 мкг/дл	0.00
	250,000 мкг/дл	0.00
Фенілбутазон	5,000 мкг/дл	0.00
	1,000,000 мкг/дл	0.00
6-н-пропіл-2-тіоурацил	1,000 мкг/дл	0.00
	10,000 мкг/дл	0.00
	25,000 мкг/дл	0.00
Саліцилова кислота	500 мкг/дл	0.00
	50,000 мкг/дл	0.00
	100,000 мкг/дл	0.00
Ацетилсаліцилова кислота	5,000 мкг/дл	0.32
	50,000 мкг/дл	0.42

17. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Точні і надійні результати можна отримати ,тоді коли процедура аналізу проводилася відповідно до лабораторної практики та дотримання інструкцій.
- Результати, отримані за допомогою цього набору, повинні використовуватися лише як доповнення до інших діагностичних процедур та інформації, доступної лікарю.
- Зразки сироватки з концентрацією Т4 більше, ніж 25 мкг / дл повинні бути представлені як такі. Для додаткового кількісного вимірювання, зразок слід розбавити Zero Standard і повторно проаналізувати. Отримане значення слід потім помножити на коефіцієнт розведення, щоб отримати справжнє значення сироватки.
- Інкретичні зразки зі значеннями білірубину до 5 мг / дл не впливають на аналіз. Крім того, додані рівні гемоглобіну до 100 мг / дл не впливають на значення Т4.
- На загальні значення сироватки Т4 можуть впливати різні фактори, крім щитовидної залози. Високий рівень ТТГ, вагітність, естрогенна терапія, оральні контрацептиви, гепарин, фенітоїн та пропанолол можуть призвести до недійсних результатів.
- Процедура промивання є критичною. Недостатнє промивання призведе до поганої точності та помилково підвищених показників поглинання.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/170 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

