

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ТИРОКСИН ВІЛЬНИЙ (Т4 ВІЛЬНИЙ) ELISA

Free FT-4 ELISA

Кат. №: EIA-2386

Дата випуску інструкції: 09-2022

Кількість тестів: 96

Версія: 19.0



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

Використовувати тільки для *in vitro* діагностики

Зберігати при температурі від 2 °C (°C) до 8 °C (°C).

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Для кількісного визначення концентрації Вільного Тироксину (fT4) в сироватці людини.

1.1 Вступ

L-Тироксин (Т4) або 3,5,3',5'-тетрайодтиронін - це гормон щитовидної залози, який найчастіше вимірюють для діагностики функції щитовидної залози. Т4 має основний вплив на синтез білка та споживання кисню практично в усіх тканинах, але він також важливий для росту, розвитку та статевого дозрівання.

Т4 синтезується щитовидною залозою і виділяється в кров. Тут Т4 зв'язується з білками сироватки для транспортування до клітин. Основним транспортним білком є Тироксинзв'язуючий Глобулін (ТЗГ), на який зазвичай припадає 80% зв'язаного Т4. Інші білки, що зв'язують гормони щитовидної залози, - це Преальбумін, що зв'язує Тироксин, і Альбумін. Більша частина сироваткового Т4 зв'язана з цими транспортними білками, залишаючи лише близько 0.03% вільного для впливу на клітини. Це Вільний Т4 (fT4), який представляє метаболічно активну фракцію; з цієї причини вимірювання концентрації вільного Т4 вважається індикатором стану щитовидної залози пацієнта.

Первинний гіпотиреоз призводить до недостатнього вироблення Т4 щитовидною залозою і, як наслідок, аномально низької концентрації вільного Т4 у крові. Первинний гіпертиреоз призводить до надмірного вироблення Т4 щитовидною залозою та, як наслідок, підвищення концентрації вільного Т4.

Загальні концентрації Т4 в сироватці крові залежать від рівня циркулюючого ТЗГ, а також від статусу щитовидної залози пацієнта. На концентрацію ТЗГ можуть впливати деякі лікарські засоби, стероїдні гормони, вагітність і різні нетиреоїдні захворювання. У попередньому поколінні тестів функції щитовидної залози вплив змінної концентрації ТЗГ розглядався шляхом обчислення індексу вільного тироксину (ІВТ). Цей ІВТ є продуктом концентрації загального Т4 та Т3-Uptake (TU), який оцінює кількість доступних сайтів зв'язування на ТЗГ. Цей підхід вимагає проведення двох окремих аналізів (загального Т4 і TU), але забезпечує кращий показник статусу щитовидної залози, ніж лише загальний Т4.

Тести для визначення вільного Т4 призначені для прямого відображення рівноваги, яка існує в сироватці крові між Т4 і Т4, зв'язаним з ТЗГ. Ці методи, включаючи цей тест для визначення вільного Т4, зазвичай можуть відображати статус щитовидної залози в одному аналізі.

2 ПРИНЦИП ТЕСТУ

Аналіз fT4 є твердофазним конкурентним імуоферментним аналізом. Зразки сироватки пацієнта, стандарти та робочий реагент кон'югату Тироксин-фермент додаються в лунки мікропланшета, покриті моноклональним антитілом Т4. Вільний Т4 у зразку пацієнта і кон'югат, мічений Т4, конкурують за доступні сайти зв'язування на антитілах. Після 60-хвилинної інкубації при кімнатній температурі, лунки промиваються водою для видалення незв'язаного кон'югату Т4. Потім додається розчин Н₂О₂/ТМБ і інкубується протягом 20 хвилин, в результаті чого відбувається розвиток блакитного забарвлення. Розвиток забарвлення зупиняється додаванням 3N HCl і абсорбція вимірюється спектрофотометрично при 450 нм (nm). Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості присутнього ферменту і обернено пропорційна кількості неміченого вільного Т4 в зразку. Концентрація вільного Т4 в невідомих зразках

визначається кількісно відповідно до серії стандартів вільного Т4, які аналізуються таким же способом.

3 РЕАГЕНТИ

3.1 Матеріали, які постачаються з набором

1. **Мікропланшет з нанесеними** антитілами (1 планшет, 96 лунок)
Мікротитраційні лунки, покриті Анти-Т4
2. Реагент **Кон'югату fT4-фермент**, готовий до використання (1 флакон, 10.5 мл (ml))
Містить антитіла до Т4, кон'юговані з пероксидазою хрому, та консерванти
3. Референсний **Стандарт** Вільного Т4, набір (1.0 мл (ml)/флакон)
Шість флаконів референсної сироватки для Вільного Т4 при приблизних* концентраціях 0-0.4-1.1-2.2-4.1 і 8.0 нг/дл (ng/dl). Додано консервант; рідкий, готовий до використання
*Точні рівні вказані на етикетках відповідно до конкретного лоту
Для одиниць SI: 1 нг/дл (ng/dl) x 12.9 = пмоль/л (pmol/l)
4. **Кольоровий реагент А**, (1 пляшка, 13 мл (ml))
Містить перекис водню в ацетатному буфері
5. **Кольоровий реагент В**, (1 пляшка, 13 мл (ml))
Містить 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ), стабілізований у буферному розчині.
6. **Стоп-розчин**, (3N HCl) (1 пляшка, 10 мл (ml))
Містить розведену соляну кислоту

3.2 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором:

- Дозатор зі здатністю внесення об'ємів 50 мкл (μl) з точністю вище, ніж 1.5%.
- Диспенсер(и) для повторного внесення об'ємів 0.050 мл (ml) і 0.200 мл (ml) з точністю вище, ніж 1.5%.
- Зчитувач мікропланшетів із здатністю абсорбції на довжині хвилі 450 нм (nm).
- Тестові пробірки для розведення ферментного кон'югату і для змішування Кольорового Реагенту А і Кольорового Реагенту В.
- Абсорбуючий папір для висушування лунок мікропланшета.
- Таймер.
- Контрольна сироватка для контролю якості.

4 ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

Сироватку отримують зі зразків цільної крові, отриманих з відповідними техніками забору.

Набір призначений для роботи тільки зі зразками сироватки без додатків. Зразки сироватки можуть зберігатися в холодильнику при 2-8 °C (°C) максимум 48 годин. Якщо зразки не будуть проаналізовані протягом 48 годин, вони можуть зберігатися при температурі -20 °C (°C) до 30 днів.

5 ЗБЕРІГАННЯ НАБОРУ ТА ІНСТРУМЕНТАРІЮ

Нерозкриті тест-набори слід зберігати при температурі 2-8 °C (°C) після отримання, а мікропланшет слід зберігати в герметичному пакеті з осушувачами, щоб мінімізувати вплив вологого повітря.

Відкриті тестові набори залишатимуться стабільними до закінчення зазначеного терміну придатності за умови зберігання, як описано вище.

Зчитувач мікропланшетів з пропускнуою здатністю 10 нм (nm) або менше та діапазоном оптичної густини 0-2 OD або більше на довжині хвилі 450 нм (nm) прийнятний для використання для вимірювання абсорбції.

6 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТУ

Розчин Робочого Субстрату - приготуйте безпосередньо перед використанням.

Для приготування розчину Н₂О₂/ТМБ приготуйте змішування 1:1 Кольорового Реагенту А і Кольорового Реагенту В за 1 годину до використання. Обережно перемішайте, щоб забезпечити повне змішування.

Підготовлений розчин реагенту Н₂О₂/ТМБ повинен бути готовий за 15 хвилин до використання і є стабільним при кімнатній температурі в темряві до 3 годин. Необхідно утилізувати залишок після використання.

7 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перш ніж приступити до аналізу, нагрійте всі реагенти, референсні сироватки та контролю до кімнатної температури (18-25 °C (°C)).

1. Підготуйте лунки мікропланшета для кожної референсної сироватки, контролю і зразка пацієнта для аналізу в дублях.
2. Внесіть по 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) відповідної референсної сироватки, контролю і зразка у відповідні лунки.

- Внесіть 0.100 мл (ml) (100 мкл (μl)) реагенту кон'юганту Т4-фермент в усі лунки.
- Обережно покрутіть мікропланшет протягом 20-30 секунд, щоб перемішати.
- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 60 хвилин.
- Видаліть інкубаційну суміш, видаливши вміст планшета в контейнер для відходів. Промийте та спорожніть мікропланшет 5 разів деіонізованою водою. Різко стукніть мікропланшетом об абсорбуючий папір або паперові рушники, щоб видалити всі залишкові краплі води.
- Додайте по 0.200 мл (ml) (200 мкл (μl)) Розчину Робочого Субстрату в кожен лунку (див. розділ Підготовка реагенту). **Завжди додавайте реагенти в тому самому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.** Акуратно перемішайте протягом 10 секунд.
- Інкубуйте при кімнатній температурі в темряві протягом 20 хвилин.
- Зупиніть реакцію внесенням 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) 3N HCl (Стоп-розчин) в кожен лунку.
- Обережно перемішайте протягом 30 секунд. **Дуже важливо, щоб блакитний колір повністю змінився на жовтий.**
- Зчитайте абсорбцію при 450 нм (nm) за допомогою пристрою для зчитування лунок мікропланшета протягом 30 хвилин.

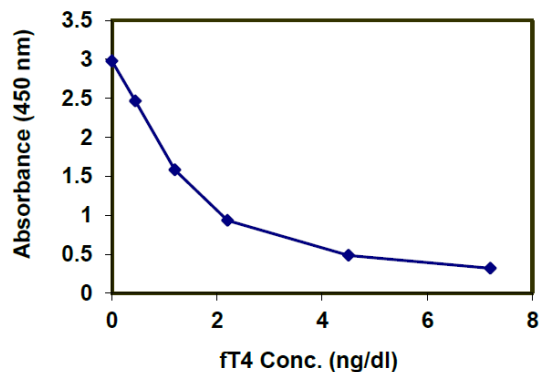
8 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Розрахуйте середні значення абсорбції (A_{450}) для кожного набору референсних стандартів, контролів і зразків пацієнтів.
- Побудуйте стандартну криву, відклавши на міліметровому папері середні значення абсорбції, отримане для кожного референсного стандарту, проти його концентрації в нг/дл (ng/dl), зі значеннями абсорбції на вертикальній осі або осі Y, а концентраціями на горизонтальній осі або осі X.
- Використовуйте середні значення абсорбції для кожного зразка, щоб визначити відповідну концентрацію вільного Т4 у нг/дл (ng/dl) за стандартною кривою.

8.1 Приклад стандартної кривої

Результати типового стандартного циклу зі значеннями оптичної густини при 450 нм (nm) показані на осі Y проти концентрацій вільного Т4, показаних на осі X. Ця стандартна крива призначена лише для ілюстрації та не повинна використовуватися для обчислення невідомих. Кожен користувач повинен отримати власні дані та стандартну криву в кожному аналізі.

Вільний Т4 (нг/дл (ng/dl))	Абсорбція (450 нм (nm))
0	2.797
0.45	2.465
1.2	1.582
2.2	0.934
4.5	0.487
7.2	0.320



Absorbance (450 nm) - Абсорбція (450 нм)
FT4 Conc. (ng/dl) - Конц. Вільного Т4 (нг/дл)

9 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Достовірність

Тест-систему для мікропланшетного визначення Вільного Т4 методом ІФА порівнювали з методом радіоімунологічного аналізу в пробірці з покриттям. Були використані біологічні зразки з гіпотиреоїдних,

еутиреїдних і гіпертиреїдних популяцій (значення коливалися від 0.1 нг/дл (ng/dl) до 8 нг/дл (ng/dl)). Загальна кількість таких зразків склала 166. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції були розраховані для цієї Тест-системи для визначення Вільного Т4 ІФА у порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в наступній таблиці:

Метод	Середнє (X)	Аналіз найменшої квадратної регресії	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	1.60	$y = 0.9513(x) + 0.0582$	0.9597
Референсний	1.64		

Близькість середніх значень вказує лише на незначну похибку між цим методом і референсним методом. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції вказують на чудову узгодженість методу.

9.2 Точність

Точність тестування в аналізі та між аналізами Тест-системи для мікропланшетного визначення Вільного Т4 методом ІФА визначали за допомогою аналізів трьох різних рівнів пулу контрольних сироваток. Кількість, середні значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток наведено в наступних таблицях:

Точність в аналізі (Значення у нг/дл (ng/dl))

	Низький	Середній	Високий
Кількість (n)	20	20	20
Середнє	0.550	1.740	3.250
1 S.D.	0.061	0.074	0.106
C.V.%	10.98	4.26	3.25

Точність між аналізами (Значення у нг/дл (ng/dl))

	Низький	Середній	Високий
Кількість (n)	10	10	10
Середнє	0.480	1.410	3.490
1 S.D.	0.052	0.085	0.279
C.V.%	10.81	6.01	7.90

9.3 Специфічність

Перехресну реактивність розраховували шляхом отримання співвідношення між дозою інтерферуючої речовини та дозою тироксину, необхідною для витіснення такої ж кількості кон'югату.

Перехресно реагуюча речовина	% Перехресної реактивності	Концентрація
I-Тироксин (Т4)	100	----
d-Тироксин	98	10 мкг/дл (μg/dL)
I-Трийодтиронін (Т3)	3.0	100 мкг/дл (μg/dL)
d-Трийодтиронін	1.5	100 мкг/дл (μg/dL)
Дийодтиронін	0.01	100 мкг/мл (μg/mL)
Дийодтирозин	0.01	100 мкг/мл (μg/mL)
Йодтирозин	0.01	100 мкг/мл (μg/mL)
Фенітоїн	N/B	40 мкг/мл (μg/mL)
Саліцилат натрію	N/B	500 мкг/мл (μg/mL)
ТЗГ	N/B	40 мкг/мл (μg/mL)
Альбумін	N/B	40 мг/мл (mg/mL)
Фенілбутазон	N/B	10 мкг/мл (μg/mL)

9.4 Чутливість

Чутливість набору становить 0.05 нг/дл (ng/dl). Чутливість була встановлена шляхом визначення варіабельності калібратора сироватки 0 нг/дл (ng/dl) і використання статистики 2σ (95% вірогідності) для розрахунку мінімальної дози.

10 ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Було проведено дослідження еутиреїдного дорослого населення, щоб визначити очікувані значення для Тест-системи FT4 ІФА. Середні значення (X), стандартні відхилення (σ) та очікувані діапазони ($\pm 2\sigma$) представлені в наступній таблиці:

Очікувані значення для Тест-системи fT4 ІФА (у нг/дл (ng/dl))

	Дорослі (89 зразків)	Вагітні (31 зразок)
Середнє значення (X)	1.40	1.50
Стандартне відхилення (σ)	0.30	0.37
Очікувані діапазони (±2σ)	0.8-2.0	0.76-2.24

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які, як очікується, буде знайдено за допомогою даного методу для популяції «нормальних» людей, залежить від кількох факторів: специфічності методу, популяції, що тестується, і точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, лише до тих пір, поки внутрішній діапазон не буде визначений аналітиками за допомогою методу з корінним населенням території, в якій розташована лабораторія.

11 КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Зміни в концентрації зв'язуючих білків у сироватці зазвичай призводять до відповідної зміни концентрації загального Т4, тоді як рівень фізіологічно активного вільного Т4 залишається в основному незмінним у еутиреоїдній людини. Таким чином, визначення концентрації вільного Т4 може забезпечити більш точну оцінку стану щитовидної залози, ніж вимірювання загального Т4. Підвищені концентрації вільного Т4 вказують на гіпертиреоз, а низькі рівні вказують на гіпотиреоз.

12 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

1. Надійні та відтворювані результати будуть отримані, якщо процедура аналізу виконується з повним розумінням інструкцій і з дотриманням належної лабораторної практики.
2. Процедура промивання є критичною. Недостатнє промивання призведе до низької точності та хибно підвищених показників абсорбції.
3. Зразки сироватки, які демонструють значну ліпемію, значний гемоліз або помутніння, не слід використовувати з цим тестом.
4. Тільки для професійного використання. Результати, отримані в результаті використання цього набору, слід використовувати лише як доповнення до інших діагностичних процедур та інформації, доступної лікарю.
5. Якщо набір не працює, скористайтеся альтернативною процедурою діагностики або зверніться до виробника.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
Вул. Фрауенберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел.: +49(0) 64 21/17 00 0
Факс: +49(0) 64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drg@drg-diagnostics.de



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014, Україна
тел.: +38 (067) 343-67-64
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

