

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ВІЛЬНИЙ ТИРОКСИН ELISA

Free T4 ELISA

Каталог. №: **EIA-3775**

Дата випуску інструкції: **2017/10**
Версія **1.0**



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

1. ВСТУП

1.1 Призначення

Набір **DRG Вільний тироксин ELISA** – це імуноферментний аналіз для кількісного *in vitro* діагностичного вимірювання вільного тироксину (fT4) в сироватці або плазмі (ЕДТА-, гепарин- або цитратна плазма).

1.2 Короткий опис та пояснення

L-тироксин (T4) або 3,5,3', 5'-тетрайодтиронін синтезується щитовидною залозою і виділяється у кров (1). Тут T4 зв'язується з транспортними білками сироватки, залишаючи лише близько 0.03% вільного T4 (fT4). Основним транспортним білком є тироксин зв'язуючий глобулін (ТЗГ), який зазвичай становить 70% зв'язаного T4. Іншими білками, що зв'язують гормони щитовидної залози, є преальбумін, зв'язуючий тироксин, та альбумін (2).

T4 має основний вплив на синтез білка та споживання кисню практично у всіх тканинах, але він також важливий для росту, розвитку та статевого дозрівання (3).

Щитовидна залоза регулюється тиреотропін-рилізинг-гормоном (ТРГ) і тиреотропним гормоном (ТТГ). На додаток до регулювання ТРГ/ТТГ зворотним зв'язком з гормонами щитовидної залози, існує центральна модуляція за допомогою харчових сигналів, таких як лептин, а також пептидів, що регулюють апетит. (4).

Вимірювання концентрації fT4 вважається цінним параметром, якщо концентрація ТТГ виходить за межі норми. Оскільки fT4 являє собою метаболічно активну фракцію T4 у сироватці, вона відображає фактичне вироблення гормону щитовидної залози.

Первинний гіпотиреоз призводить до недостатнього вироблення T4 щитовидною залозою, а отже, до аномально низької концентрації циркулюючого fT4 у крові (5). Первинний гіпертиреоз призводить до надмірного вироблення T4 щитовидною залозою, що призводить до підвищення концентрації fT4 (6).

2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

DRG Вільний Тироксин ELISA - це твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), заснований на **принципі конкурентного зв'язування**.

Мікротитрові лунки покриті моноклональним (мишачим) антитілом, спрямованим до унікального антигенного сайту молекули тироксину (T4). Ендогенний fT4 зразка пацієнта конкурує з кон'югатом T4-пероксидази хрону за зв'язування з покритим антитілом. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається.

Кількість зв'язаного кон'югату пероксидази обернено пропорційна концентрації fT4 у зразку. Після додавання розчину субстрату інтенсивність кольору обернено пропорційна концентрації fT4 у зразку пацієнта.

3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Цей набір призначений тільки для діагностики *in vitro*. Тільки для професійного використання.
2. Всі реагенти цього тест-набору, які містять людську сироватку або плазму, були протестовані і виявлені негативними до ВІЛ I/II, HbsAg та HCV за допомогою схвалених FDA процедур. Проте, всі реагенти слід розглядати як потенційно небезпечні під час використання та утилізації.
3. Перед початком аналізу, повністю та уважно прочитайте інструкцію. Використовуйте тільки дійсну версію інструкції-вкладиша, яка постачається з набором. Переконайтеся, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет містить відривні смужки. Не використані лунки потрібно зберігати при температурі від 2°C до 8°C у герметичній упаковці та використовувати з рамкою, яка постачається.
5. Піпетування зразків та реагентів потрібно проводити якомога швидше в тій самій послідовності для кожного етапу.
6. Використовуйте контейнери тільки для одного реагенту. Це особливо стосується контейнерів для субстрату. Використання

контейнера для розчину субстрату, який до того, використовувався для розчину кон'югату може спричинити забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакони так, як може відбутися забруднення реагенту.

7. Ретельно перемішайте вміст мікропланшетних лунок, щоб забезпечити добрі результати аналізів. Не використовуйте повторно мікролунки.
8. Не допускайте, щоб лунки висихали під час аналізу; додавайте реагенти негайно після завершення етапів промивання.
9. Почекайте поки реагенти досягнуть кімнатної температури (21°C до 26°C) перед початком тестування. Температура може вплинути на показники поглинання аналізу. Проте, на значення для зразків пацієнта не впливатиме.
10. Ніколи не піпетуйте ротом та уникайте контакту реагентів та зразків зі шкірою та слизовими оболонками.
11. Не куріть, не їжте, не пийте та не користуйтеся косметикою у місцях обробки зразків або реагентів набору.
12. Одягайте одноразові латексні рукавиці під час обробки зразків та реагентів. мікробне забруднення реагентів або зразків може дати неправильні результати.
13. Обробка повинна здійснюватися у відповідності з процедурами, визначеними відповідними національними правилами безпеки щодо біологічної небезпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, який вказаний на етикетці.
15. Всі вказані обсяги повинні виконуватися відповідно до протоколу. Оптимальні результати тесту можна отримати тільки після використання відкаліброваних піпеток та мікропланшетного зчитувача.
16. Не змішуйте або використовуйте компоненти з наборів з різними номерами лотів. Не рекомендується міняти лунки різних пластин навіть одного лоту. Набори можуть транспортуватися або зберігатися в різних умовах, а характеристики зв'язування пластин можуть дещо відрізнятись.
17. Уникайте контакту зі Стоп Розчином, який містить 0.5 M H₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри або опіки.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND, та/або MIT в якості консервантів. У випадку попадання в очі або на шкіру негайно промити водою.
19. ТМБ субстрат має подразнюючу дію на шкіру та слизову. У випадку попадання в очі, промийте достатньою кількістю води, а шкіру промийте з милом та великою кількістю води. Промийте забруднені об'єкти перед повторним використанням. При вдиханні – виведіть людину на свіже повітря.
20. Хімічні речовини та підготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до правил або вимог національної біологічної безпеки.
21. Щодо інформації про небезпечні речовини, які входять до набору зверніться до Паспорта безпеки даних. Паспорт безпеки даних для цього продукту доступний за запитом безпосередньо від DRG.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, що постачаються у наборі

1. **Мікротитрові лунки**, 12 x 8 (відривні) смужки, 96 лунок; Лунки покриті антитілом (моноклональним) проти Тироксину.
2. **Стандарт (Стандарт 0-5)**, 6 флаконів, по 1 мл кожен, готові до використання; Концентрації: 0 - 0.5 - 1.0 - 2.0 - 4.0 - 8.0 нг/дл
Конверсія: 1 нг/дл x 12.9 = пмоль/л
Містить нертутний консервант.
3. **Контроль низький та високий**, 2 флакони, по 1 мл кожен, готові до використання; Значення та діапазони для контролів дивитися на етикетці або Сертифікаті контролю якості. Містить нертутний консервант.
4. **Ферментний кон'югат***, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Тироксин кон'югований до пероксидази хрону. Містить нертутний консервант.
5. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 25 мл, готовий до використання, Тетраметилбензидин (ТМБ).
6. **Стоп Розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0.5 M H₂SO₄. Уникайте контакту зі стоп розчином. Це може спричинити подразнення шкіри та опіки.
7. **Промивний розчин***, 1 флакон, 30 мл (40X концентрований), див. «Підготовка реагентів».

Примітка: Додатковий 0 Стандарт для розведення зразків доступний за запитом.

4.2 Необхідні матеріали, які не постачаються

- Мікропланшетний відкалібрований зчитувач (450/620 ± 10 nm)(напр. DRG Instruments Microtiter Plate Reader)

- Відкалібровані змінні прецизійні мікропіпетки
- Абсорбуючий папір
- Деіонізована або дистильована вода
- Таймер
- Графічний папір або програмне забезпечення для обробки даних

4.3 Умови зберігання

За умови зберігання при температурі 2 - 8°C закриті реагенти залишаються реактивними до закінчення терміну придатності. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Відкриті реагенти слід зберігати при температурі 2°C - 8°C. Мікротитрові лунки потрібно зберігати при температурі 2°C - 8°C. Якщо герметичний мішечок відкрили, то знову щільно закрийте його. Відкриті набори зберігають активність протягом 8 тижнів, за умови зберігання як описано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Доведіть усі реагенти та необхідну кількість смужок до кімнатної температури (від 20°C до 25°C) перед тестуванням.

Промивний розчин

Додати деіонізовану воду до 40X концентрованого Промивного розчину. Розвести 30 мл концентрованого Промивного розчину з 1170 мл деіонізованої води до кінцевого об'єму 1200 мл.
Розведений Промивний розчин стабільний протягом 2 тижнів при кімнатній температурі.

4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору слід робити відповідно до національних вимог. Спеціальну інформацію про цей продукт можете знайти у Паспорті безпеки матеріалів, розділ 13.

4.6 Пошкодження тестових наборів

У разі виникнення серйозних пошкоджень тестового набору або компонентів, компанію DRG слід проінформувати у письмовій формі не пізніше, ніж через тиждень після отримання набору. Сильно пошкоджені окремі компоненти не повинні використовуватися для тестового прогону. Їх потрібно зберігати, поки не буде знайдено остаточне рішення. Після цього їх слід утилізувати відповідно до офіційних правил.

5. ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

У цьому аналізі можна використовувати сироватку або плазму (ЕДТА-, гепарин- або цитратну плазму).

Не використовувати гемолітичні, іктеричні або ліпемічні зразки.

Зверніть увагу: Зразки, що містять азид натрію не можна використовувати в аналізі.

5.1 Забір зразка

Сироватка:

Зробіть забір крові шляхом венепункції (напр. Sarstedt Monovette для сироватки), дозвольте згорнутися, та відділіть сироватку шляхом центрифугування при кімнатній температурі. Не центрифугуйте, поки кров повністю не згорнеться. Для зразків крові пацієнтів, які отримують антикоагулянтну терапію, потрібно більше часу для згортання.

Плазма:

Цільну кров потрібно зібрати у центрифужні пробірки, які містять антикоагулянт (напр. Sarstedt Monovette з відповідно підготовленою плазмою) та центрифугувати негайно після забору.

5.2 Зберігання та підготовка зразка

Зразки потрібно зберігати закритими до 7 днів при температурі 2°C - 8°C перед тестуванням.

Для довготривалого зберігання (до 1 місяця), зразки потрібно заморозити при температурі -20°C тільки один раз. Розморожені зразки слід інвертувати кілька разів перед тестуванням.

5.3 Розведення зразків

Якщо в початковому аналізі зразок містить більше ніж найвищий стандарт, зразки можна розбавити 0 стандартом і повторно провести аналіз, як описано в Процедурі Аналізу.

Для розрахунку концентрацій цей коефіцієнт розведення слід враховувати.

Приклад:

- а) розведення 1:10: 10мкл зразок+90 0 Стандарт (ретельно перемішати)
- б) розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл 0 Стандарт (ретельно перемішати).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Дуже важливо довести всі реагенти та зразки до кімнатної температури перед використанням. Усі реагенти слід перемішати без утворення піни.
- Якщо тестування розпочато, то всі етапи слід пройти без перерви.
- Використовуйте новий одноразовий пластиковий наконечник для кожного стандарту, контролю або зразка, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Абсорбція – це функція часу інкубації та температури. Перед початком аналізу, рекомендується, щоб усі реагенти були готові, кришечки зняті, всі необхідні лунки закріплені на тримачі і т. д. Це забезпечить рівний час для кожного етапу піпетування без переривання.
- Як правило, ферментативна реакція лінійно-пропорційна до часу та температури.

6.2 Процедура тестування

Кожен пробіг повинен включати стандартну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок на тримачі.
2. Додайте **50 мкл** кожного **Стандарту, контролю** та **зразків** з новими одноразовими наконечниками у відповідні лунки.
3. Додайте **100 мкл Ферментного кон'югату** у кожну лунку. ретельно перемішайте протягом 10 секунд. На цьому етапі важливо повністю перемішати.
4. Інкубувати протягом **60 хвилин** при кімнатній температурі.
5. Різько витрусіть вміст лунок.
Промийте лунки **4 рази** з **400 мкл** розведеного *Промивного розчину* на лунку. Різько потрусити лунки на абсорбуючий папір, щоб видалити залишки крапель.
Важлива примітка: На чутливість та точність цього аналізу помітно впливає правильне виконання процедури миття!
6. Додати **150 мкл Розчину субстрату** у кожну лунку.
7. Інкубувати протягом **30 хвилин** при кімнатній температурі.
8. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл Стоп-розчину** у кожну лунку.
9. Визначіть абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450±10 нм** за допомогою зчитувача мікротитрових планшетів. Рекомендується зчитувати усі лунки **протягом 10 хвилин** після додавання *Стоп розчину*.

6.3 Вимірювання

1. Обчисліть середні значення поглинання для кожного набору стандартів, контролів та зразків пацієнтів.
2. Використовуючи напівлогарифмічний міліметровий папір, побудуйте стандартну криву, позначивши середнє значення поглинання, отримане з кожного стандарту, проти його концентрації зі значенням поглинання на вертикальній осі (Y) та концентрацію на горизонтальній осі (X).
3. Використовуючи середнє значення поглинання для кожного зразка, визначіть відповідну концентрацію за стандартною кривою.
4. Автоматизований метод: результати в Інструкції з використання були розраховані автоматично за допомогою 4-параметричної кривої. (4 параметри Parabard Rodbard або 4 Parameter Marquardt є кращими методами.) Інші функції зменшення даних можуть дати дещо інші результати.
5. Концентрацію зразків можна зчитувати безпосередньо з цієї стандартної кривої. Зразки з концентраціями, вищими за концентрацію найвищого стандарту, слід додатково розбавляти або повідомляти як > 8 нг/дл. Для розрахунку концентрацій цей коефіцієнт розведення слід враховувати.

6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані призначені лише для демонстрації та **не можуть** бути використані замість генерації даних на момент аналізу.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0	0.0 нг/дл
Стандарт 1	0.5 нг/дл
Стандарт 2	1.0 нг/дл
Стандарт 3	2.0 нг/дл
Стандарт 4	4.0 нг/дл
Стандарт 5	8.0 нг/дл

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Настійно рекомендується, щоб кожна лабораторія визначала свої значення норми та патології.

У дослідженні, проведеному зі здоровими особами, за допомогою DRG Free T4 ELISA спостерігалися наступні дані:

Населення	к-сть	Середнє значення (нг/дл)	Медіан (нг/дл)	2.5 ^а – 97.5 ^а процентиля (нг/дл)	Діапазон (мін. – макс.) (нг/дл)
Чоловіки	60	1.03	0.96	0.74-1.77	0.68 – 1.88
Жінки	60	0.93	0.89	0.70-1.27	0.66 – 1.79

Окремі результати не повинні бути єдиною причиною для будь-яких терапевтичних висновків. Результати слід співвідносити з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб контроль запускали з кожною калібрувальною кривою. Статистично значну кількість контролів слід перевірити, щоб встановити середні значення та допустимі діапазони для забезпечення належних показників.

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних та федеральних норм. Рекомендується використовувати контрольні зразки для забезпечення повсякденної достовірності результатів. Використовуйте контролі як на нормальному, так і на патологічному рівні. Контролі та відповідні результати лабораторії контролю якості зазначені у сертифікаті контролю якості, доданому до набору. Значення та діапазони, зазначені в Сертифікаті контролю якості, завжди відносяться до поточної партії набору і повинні використовуватися для прямого порівняння результатів.

Також рекомендується використовувати національні або міжнародні програми оцінки якості для забезпечення точності результатів. Використовуйте відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень та тенденцій. Якщо результати аналізу не відповідають встановленим допустимим діапазонам контрольних матеріалів, результати пацієнта слід вважати недійсними.

У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні області: Пристрої для піпетування та вимірювання часу; фотометр, термін придатності реагентів, умови зберігання та інкубації, методи аспірації та промивання. Якщо ви перевірили вищевказані пункти і не знайшли жодної помилки, зверніться безпосередньо до свого дистриб'ютора або DRG.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу становить від 0.22 до 8.0 нг/дл.

9.2 Специфічність антитіл (Перехресна реактивність)

Наступні речовини були протестовані на перехресну реактивність аналізу:

Речовина	Перехресна реактивність (%)
T4	0.03
T3	0.01

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість DRG ELISA була розрахована шляхом віднімання 2 стандартних відхилень від середнього значення 20 повторних аналізів стандарту 0 і виявлено, що вона становить 0.22 нг/дл.

Межа бланку (LoB) становить 0.20 нг/дл.

Межа виявлення (LoD) становить 0.271 нг/дл.

Межа кількісного визначення (LoQ) становить 0.298 нг/дл.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 В аналізі

Змінюваність в аналізі показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє значення (нг/дл)	КВ %
1	10	0.49	7.2
2	10	1.20	6.9
3	10	4.30	1.7
4	10	7.06	1.2

9.4.2 Між аналізами

Варіації між аналізами показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє значення (нг/дл)	КВ %
1	30	0.47	6.9
2	30	1.20	4.8
3	30	4.26	1.5
4	30	7.00	1.0

9.4.3 Між лотами

Відхилення між аналізами (між лотами) визначали шляхом повторних вимірювань 4 зразків у 3 різних лотах наборів.

Зразок	К-сть	Середнє значення (нг/дл)	КВ %
1	18	0.53	14.5
2	18	1.29	3.6
3	18	2.2	6.5
4	18	4.29	7.2

9.5 Відновлення

Відновлення визначали шляхом додавання чотирьох зростаючих концентрацій аналіту до чотирьох різних зразків пацієнтів, що містять різну кількість ендogenous аналіту. Кожен зразок (неспайковий та спайковий) аналізували, а концентрації аналітів у зразках розраховували за стандартною кривою. Відсоток відновлення визначали шляхом порівняння очікуваних та вимірюваних значень зразків.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	Зразок 4
Концентрація (нг/дл)	1.55	2.16	3.85	4.12
Середнє відновлення (%)	102.5	97.5	100.8	106.6
Діапазон відновлення (%)	Від	90.9	85.0	93.1
	до	111.2	105.9	113.3

9.6 Лінійність

Чотири зразки, що містять різні кількості аналіту, послідовно розбавляли Стандарт 0. Відсоток відновлення розраховували шляхом порівняння очікуваних та вимірюваних значень для аналіту.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	Зразок 4
Концентрація (нг/дл)	1.26	2.08	2.97	5.33
Середнє відновлення (%)	103.9	100.1	103.8	105.5
Діапазон відновлення (%)	Від	96.6	96.5	98.0
	до	111.2	103.8	113.0

10 ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу буде виконана з повним розумінням інструкції та з дотриманням належної лабораторної практики.

Будь-яке неналежне поводження зі зразками або зміна цього випробування можуть вплинути на результати.

10.1 Інтерферуючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) та тригліцериди (до 7.5 мг/мл) не впливають на результати аналізу.

10.2 Інтерференції ліків

До сьогодні нам не відомі речовини (ліки), які впливають на вимірювання вільного тироксину у зразку.

10.3 Хук-ефект високої дози

У цьому тесті не було виявлено хук-ефекту.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Надійність результатів

Випробування необхідно проводити точно згідно з інструкціями виробника. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (Доброї лабораторної практики) або інших застосованих національних стандартів та / або законів. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати, в процедурі тестування, достатню кількість контролів для перевірки точності та достовірності тесту.

Результати випробувань є дійсними, тільки якщо всі контролі знаходяться в межах вказаних діапазонів, і якщо всі інші параметри випробувань також входять до заданих специфікацій аналізу. У разі виникнення будь-яких сумнівів або занепокоєння звертайтеся до DRG.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки ніколи не повинні ґрунтуватися тільки на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати випробувань узгоджуються з пунктами 11.1. Будь-який лабораторний результат є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта. Тільки в тих випадках, коли результати лабораторних досліджень у прийнятній формі узгоджуються з загальною клінічною картиною пацієнта, слід вивести терапевтичні наслідки.

Сам результат тесту ніколи не повинен бути єдиним визначальним чинником для отримання будь-яких терапевтичних висновків.

11.3 Надійність

Будь-яка модифікація тестового набору та / або обміну або змішування будь-яких компонентів різних лотів від одного тестового набору до іншого може негативно вплинути на очікувані результати і обґрунтованість загального тесту. Такі зміни та / або обміни скасовують будь-які вимоги щодо заміни.

Претензії, подані внаслідок неправильного тлумачення результатів лабораторних досліджень згідно з пунктом 11.2, також є недійсними.

Незалежно від того, у випадку будь-якої претензії, відповідальність виробника не повинна перевищувати вартість тестового набору. Виробник не несе відповідальності за будь-які пошкодження набору, що сталися під час транспортування.



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 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

