



**Набор ИФА
для количественного определения в
сыворотке человека
ОБЩЕГО ТИРОКСИНА (Т4)**

Кат. № : KT2EW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 09-2007

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на английском языке.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящий набор основан на конкурирующем методе иммуноферментного анализа (ИФА). Т4 в образце конкурирует с Т4, конъюгированном с пероксидазой хрена (конъюгатом) за связывание с определенными областями антитела анти-Т4, нанесенными на лунки. В конце инкубации весь свободный материал удаляется циклом аспирации/промывания. Ферментная активность, обнаруживаемая в твердой фазе, будет обратно пропорциональной концентрации Т4 в калибраторах и образцах и будет наблюдаться при добавлении в лунки раствора хромогена (ТМБ) в буфере субстрата. Колориметрическое считывание будет проводиться с использованием спектрофотометра при длине волны 450 нм и 405 нм.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

3.1 Специфические реагенты

- **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок, покрытых моноклональным антителом (мишимым) анти-Т4. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой пакете тщательно закрытыми.
- **Калибраторы:** 6 флаконов (1 мл) Т4 в основе сыворотки следующих концентраций: 0, 10, 35, 70, 140 и 280 нг/мл. Готовы к использованию. Консервант: неомицин.
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (2,7 мл) Т4, конъюгированного пероксидазой хрена (HRPO), содержащем Tris HCl и стабилизаторы. Консервант: неомицин. Перед использованием добавьте 1.2 мл ферментного конъюгата в флакон с разбавителем конъюгата (12 мл); или разбавьте конъюгат 1:11 разбавителем конъюгата, исходя из объема, необходимого для анализа и тщательно перемешайте. Храните разбавленный конъюгат при 2-8°C в течение 8 недель; при более длительном хранении заморозить при -20°C.
- **Разбавитель конъюгата:** 2 флакона (12 мл) с Tris HCl, ANS и бычьим IgG. Готовый к использованию. Консервант: неомицин.
- **Контрольная сыворотка:** 1 флакон Т4 в основе сыворотки. Лиофилизированная. Консервант: неомицин. Растворить 1 мл дистиллированной воды. После растворения хранить при 2-8°C 1 неделю; при более длительном хранении заморозить при -20°C.
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.

3.2 Общие реагенты для всех наборов гормонов Radim

- **Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween. Консервант: тимеросал (<0.05%). Разбавить содержимое флакона дистиллированной водой до 500 мл. В случае нерастворимых кристаллов перерастворите раствор, поместив флакон на несколько минут в температуру 37°C. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течение 30 дней при 2-8°C.
- **Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМБ с цитрат-фосфатным буфером и DMSO. Готовый к использованию.

- **Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Готовый к использованию.
Примечание: Чтобы получить раствор субстрата смешайте равные порции хромогена и субстратного буфера, используя чистый, тщательно очищенный флакон. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течении 1 часа после подготовки.
- **Стоп раствор:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готовый к использованию.
 - Самоклеющаяся пленка.
 - Полиэтиленовый пакет.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Мерные колбы для разбавления реагентов.
- Сухожаровой шкаф, настроенный на 37±2°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с интервалом 0-3,0 А при длине волны 450 и 405 нм.
- Миллиметровая графопостроительная бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

5. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащей загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре, это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Недостаточная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов

и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.

- Убедитесь, что микропланшетный шейкер (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности систем и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорита натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Храните образцы при 2-8°C в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы в равных частях до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА*

- приведите все реагенты к комнатной температуре.

- переворачивая образец, смешайте его перед использованием.

1. Приготовьте лунки для: бланка, калибраторов, контрольной сыворотки и образцов.
2. Пипетируйте **10 мкл** каждого калибратора, контрольной сыворотки и образца в соответствующие лунки.
3. Пипетируйте **200 мкл** анти-T4-биотина во все лунки, кроме лунки бланка.
4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой и осторожно перемешайте.
5. Инкубируйте микропланшеты в течении **90 +/- 7 мин. при 37±2°C**.
6. Удалите пленку и осторожно аспирируйте инкубационную смесь из всех лунок.
7. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
8. Пипетируйте **200 мкл** раствора субстрата-хромогена в лунки.
9. Инкубируйте в течении **15 мин. при 37±2°C**. Избегайте прямого солнечного света.
10. Пипетируйте **100 мкл** стоп раствора во все лунки.
11. Считайте ОП желательнo бихроматичным фотометром при 450 нм с контрольной длиной волны 620 нм (обнулив аппарат лункой бланка) в течении **20 минут** после завершения анализа. В случае выхода абсорбции из диапазона считайте ее при 405 нм.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылаетесь на соответствующее руководство пользователя.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 23 в оригинале инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения большей чувствительности существующий метод включает спектрофотометрическое считывание при трех волнах длины 450, 405 и 620 нм. Для образцов с концентрациями T4 в диапазоне от 35 до 280 нг/мл считайте при 450 нм; для образцов с уровнями T4 ниже 35 нг/мл, считайте при 405 нм.

Нарисуйте калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибратора (ось x) напротив абсорбции для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации T4 в нг/мл получают путем интерполяции абсорбций каждого образца на калибровочной кривой.

9.1 Пример вычисления

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться вместо экспериментальных данных.

Описание (нг/мл)	Абсорбция при 450 нм	T4	Абсорбция при 450 нм	T4
Калибратор 0	> 3.000		1.946	
Калибратор 10	> 3.000		1.245	
Калибратор 35	1.247		0.430	
Калибратор 70	0.544		0.187	
Калибратор 140	0.246		0.085	
Калибратор 280	0.102		0.035	
Образец 1	0.820	53 нг/мл	0.283	
Образец 2	> 3.000		1.243	10 нг/мл

9.2 Значения нормы

Указанные ниже значения считаются показательными. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный диапазон нормы.

Значения нормы: **45-120 нг/мл**.

9.3 Критерии оценки

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что значение концентрации контрольной сыворотки указано в значении листа Контроля Качества.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Специфичность

Настоящий метод показал следующие перекрестные реакции: 1.1 % с 3,5 трийод-L-тиронином, и ниже 0.1 % с дийод-L-тиронином и 3,5 дийод-L-тирозином и 3-йод-L-тирозином.

10.2 Чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе, значительно отличающейся от нулевого калибратора (средн. значение - 3 CO).

Эта доза составляет 4,5 нг/мл.

10.3 Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения повторяемости и воспроизводимости анализа (вариабильность внутри и между анализами) на 3 сыворотках при разных концентрациях T4.

Повторяемость (в анализе)

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во репликатов
A	16.3	0.9	5.6	12
B	69.3	3.9	5.7	12
C	131.3	5.7	4.3	12

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во анализов
A	39.8	1.4	3.6	8
B	58.7	1.4	2.3	8
C	112.3	4.3	3.8	8

10.4 Соответствие

Проверена при использовании параллельных анализов.

Испытание на восстановление

Известные количества T4 были добавлены к объединению сывороток в норме и проанализированы.

Добавлено (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)	Восстановление %
P	---	98	----
P + 75	173	160	92,5
P + 37,5	135,5	128	94,5
P + 18,7	116,7	116	99,4

Испытание на параллелизм

Сыворотка с высокой концентрацией Т4 была проверена нулевым калибратором при разных разбавлениях.

Разбавление	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)
S2 неразбавл.	---	280
1:2	140	110
1:4	70	64
1:8	35	34

11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты этого анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Черновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: (0342) 77 51 22;
тел./факс: (0342) 77 56 12
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua