



Набор ИФА для количественного определения в сыворотке человека СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА (FT4)

Кат. № : KT7EW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 01-2009
Версия 4

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

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ (См. в оригинале инструкции).

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящий набор основан на конкурирующем методе иммуноферментного анализа (ИФА). В твердой фазе он использует лунки, покрытые специфическими антителами к Т4. При добавлении в лунки конъюгата и сыворотки пациента (Т3 конъюгированный пероксидазой хрена, аналогичный метод) мы получаем реакцию между сывороткой Т4 и конъюгатом в областях связывания на антителах. Эта реакция тщательно калибруется во избежание наибольшего влияния на равновесие между свободным и связывающим гормоном, таким образом позволяя правильно дозировать свободную часть образца.

В конце инкубации весь свободный материал удаляется циклом аспирации/промыывания. Ферментная активность, обнаруживаемая в твердой фазе, будет обратно пропорциональной концентрации FT4 в калибраторах и образцах и будет наблюдаться при добавлении в лунки раствора хромогена (ТМБ) в буфере субстрата. Колориметрическое считывание будет проводится 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 специфическими антителами (кролика) к Т4. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой пакет тщательно закрытыми.
- **Калибраторы:** 6 флаконов (1 мл) Т4 в основе сыворотки. Лиофилизированные Растворить 1 мл дистиллированной воды. После растворения калибраторы можно хранить при 2-8°C в течение 2 месяцев. Консервант: неомицин.
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- **Контрольная сыворотка:** 2 флакона Т4 в основе сыворотки 2 разных концентраций. Лиофилизированная. Растворить 1 мл дистиллированной воды. Растворить 1 мл дистиллированной воды. После растворения контрольную сыворотку можно хранить при 2-8°C в течение 2 месяцев. Консервант: неомицин.
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- **Ферментный конъюгат:** 2 флакона (12 мл) Т4, конъюгированного пероксидазой хрена (HRPO) в буфере HEPES со стабилизаторами. Готов к использованию. Консервант: неомицин.

3.2 Общие реагенты для всех наборов панели гормонов Radim

- **Промывочный раствор (концентрат, SL01):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween 20. Консервант: тиомерсал (<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 течении 30 дней при 2-8°C.

- **Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМБ с цитрат-фосфатным буфером и DMSO. Готов к использованию.
- **Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Готов 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.
- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готов к использованию.
 - Пленки для планшета.
 - Полиэтиленовый пакет.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Мерные колбы для разбавления реагентов.
- Микропланшетный шейкер на 1200 об./мин.
- Аспирационный насос или автоматическое оборудование для промывки планшета.
- Микропланшетный спектрофотометр для измерения абсорбции 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 содержащую 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 количеству 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. Нелюбопытная 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 системы 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. Используемые для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. 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. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Храните образцы при 2-8°C в течении 1 дня. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегать 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, контрольных сывороток и образцов.
2. Пипетируйте по **50 мкл** каждого калибратора, контрольной сыворотки и образца в соответствующие лунки.
3. Пипетируйте по **200 мкл** ферментного конъюгата во все лунки, кроме лунки бланка.
4. Накройте микропланшеты липкой пленкой и осторожно перемешайте.
5. Инкубируйте микропланшеты в течении **90 +/- 5 мин. при КТ (18-25°C)** на орбитальной шейкере при 1200 об./мин..
6. Удалите липкую 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 по **200 мкл** раствора субстрата-хромогена в лунки.
9. Инкубируйте в течение **15 мин. при КТ (18-25°C)** на орбитальной шейкере при 1200 об./мин.. Избегайте прямого солнечного света.
10. Пипетируйте по **100 мкл** стоп-раствора во все лунки.
11. Считайте ОП желательно 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. 22 в оригинале инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения большей чувствительности существующий метод включает спектрофотометрическое считывание при двух волнах (450 и 405 нм). Для образцов с концентрациями FT4 в диапазоне от 10 до 80 пг/мл считывать при 450 нм; для образцов с уровнями FT4 ниже 10 пг/мл, считывать при 405 нм.

Нарисовать калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибратора (ось x) напротив абсорбции для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации FT4 в пг/мл получаются 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	FT4	Абсорбция при 405 нм	FT4
Калибратор 0	> 3.000		4.536	
Калибратор 5	> 3.000		2.533	
Калибратор 10	1.683		-	
Калибратор 20	1.025		-	
Калибратор 40	0.398		-	
Калибратор 80	0.141		-	
Образец 1	1.346	15 пг/мл	-	

9.2 Значения нормы

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

Значения нормы:	7 – 18 пг/мл	(9 – 23 пмоль/л)
Рипотиреоз:	< 7 пг/мл	(< 9 пмоль/л)
Гипертиреоз:	> 18 пг/мл	(> 23 пмоль/л)

9.3 Коэффициент преобразования

пмоль/л = (пг/мл : 777) x 1000

9.4 Критерии достоверности

Перед началом расчета 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:

ПЕРЕКРЕСТНО-РЕАГИРУЮЩЕЕ ВЕЩЕСТВО	% перекрестной реакции
3 iodo-L-tyrosine (MIT)	0
3, 5 diiodo-L-tyrosine (DIT o T2)	0
3, 5 diiodo-L-tyronine	0
3, 3', 5, triiodo-L-tyronine (T3)	3.3%
3, 3', 5' triiodo-L-tyronine (r T3)	6.4%
3, 3', 5, 5' tetraiodo-L-tyronine (T4)	> 100%
3, 3', 5, 5' tetraiodo-D-tyronine (D-T4)	> 100%

10.2 Аналитическая чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе, значительно отличающейся от нулевого калибратора (средн. значение - 2 CO).

Эта доза составила менее **1 пг/мл**.

10.3 Функциональная чувствительность

Функциональная чувствительность выражается в дозе, соответствующей 20% КВ между анализами. Эта доза составила менее **1,5 пг/мл**.

10.4 Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения повторяемости и воспроизводимости анализа (вариабильность внутри и между анализами) на 3 сыворотках при разных концентрациях FT4.

Повторяемость (в анализе)

Сыворотка	Среднее	± (пг/мл)	СО	КВ %	К-во репликатов
a	6,2	±	0,6	9,6	10
b	13,1	±	0,6	4,6	10
c	27,2	±	0,7	2,6	10
d	72,1	±	2,6	3,6	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Среднее	± (пг/мл)	СО	КВ %	К-во репликатов
a	11,5	±	0,86	7,5	10
b	26,2	±	2,73	10,4	10
c	69,9	±	4,6	6,6	10

10.5 Тест на разбавление

В некоторой степени доза свободного гормона не зависит от белков-переносчиков; на самом деле измеренное значение FT4 в том же образце при различных разбавлениях всегда постоянное. Использовались два различных метода: а) капались уменьшающиеся объемы одного и того же образца; б) капался один объем неразбавленного и разбавленного образца в матрицу без каких-либо белков-переносчиков.

а)

Сыворотка	Объем	Измер. доза пг/мл	Сыворотка	Объем	Измер. доза пг/мл
# 1	50 мкл	28,5	# 2	50 мкл	28
	40 мкл	23,3		40 мкл	23,1
	35 мкл	23,9		35 мкл	23,3
	30 мкл	22,9		30 мкл	24,9
	25 мкл	21,7		25 мкл	21,7
	20 мкл	19,2		20 мкл	19,5
	15 мкл	18,5		15 мкл	18,8

б)

Сыворотка	Объем	Измер. доза пг/мл	Сыворотка	Объем	Измер. доза пг/мл
# 1	1/1	28,5	# 2	1/1	28
	1/1,5	24,3		1/1,5	24,3
	1/2	23,1		1/2	23
	1/2,5	21,8		1/2,5	22,4
	1/5	22		1/5	22,9

11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты анализа должны тщательно интерпретироваться и быть подтверждены клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua