



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

**Каталог. №** : E-TT4-1P

**Количество** : 96

**Производитель**: Dima Diagnostika (Германия)

*Методика от 01-2006*

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

### НАЗНАЧЕНИЕ

Тироксин (Т4) тиреоидный гормон, который циркулирует в крови, в основном в комплексной форме с протеином-носителем, главным образом тироксин-связанным глобулином (ТВГ). Только свободная (несвязанная) часть Т4 ответственна за биологическую активность. Когда концентрация протеина-носителя растет, при беременности, общий уровень Т4 изменяется, тогда как концентрация свободного Т4 остается в нормальных границах. Поэтому измерение концентрации свободного Т4 больше связано с клиническим статусом, чем уровень общего Т4. Например, рост общего Т4 связанный с беременностью, приемом контрацептивов и эстрогенной терапией, иногда результат уровня общего Т4 находится за нормальными границами, тогда как концентрация свободного Т4 остается в нормальных установленных границах. Маскирование патологической тиреоидной функции может также проявляться при гипер- и гипотиреоидных условиях увеличением концентрации ТВГ. Общий Т4 может быть увеличен и снижен изменениями ТВГ, что есть результатом нормальных установленных уровней. Концентрация свободного Т4 раскрывает актуальный клинический статус пациентов.

Этот набор методологически предоставляет оптимальную чувствительность, что требуется несколькими техническими манипуляциями. Стандарт сыворотки, образец пациента или контроль сначала добавляется в ячейку микропланшета. Добавляется конъюгат энзим-Т4, после чего реактанты смешиваются. Происходит реакция конкурирования между Т4 энзимным конъюгатом и образцом свободного Т4 за ограниченное число связанных антител, иммобилизованных на сторонах ячеек. После отделения связанного антитела энзимным конъюгатом Т4 от несвязанного энзимным конъюгатом Т4, активность энзима, присутствующего на поверхности ячейки количественно определяется реакцией с субстратом для выработки цвета.

Обслуживание нескольких стандартных сывороток с известной концентрацией свободного тироксина дает возможность построение графика активности и концентрации. При сравнении данных соответствующей кривой, активность неизвестных образцов может изменяться в соответствии с концентрацией свободного тироксина.

### ПРИНЦИП

*Эффективный иммуно-ферментный анализ.*

Необходимы точные реагенты для твердой фазы иммуно-ферментного анализа, включая иммобилизованное антитело, конъюгат энзимного антигена и природный антиген.

После смешивания иммобилизованного антитела, конъюгата энзимного антигена и сыворотки, содержащей природный свободный антиген, происходит реакция конкурирования между природным свободным антигеном и конъюгатом энзимного антигена за ограниченное число переведенных в нерастворимую форму связанных сторон.

После того, как равновесие достигнуто, фракция связанного антитела отделяется от несвязанного антигена декантацией или аспирацией. Активность энзима в фракции связанного антитела обратно пропорциональна концентрации природного свободного антигена. При использовании нескольких разных установленных сывороток с известной концентрацией антигена для построения кривой, можно получить концентрации антигенов в неизвестных образцах.

### РЕАГЕНТЫ ДЛЯ МИКРОПЛАНШЕТА (48/96 ЯЧЕЕК)

- Микропланшет** с ячейками, покрытыми антителом, **96 лунок**. Один микропланшет (12x8) на 96 ячеек. (код E-TT4-1P).
- 6 Т4-Стандарты:** готовые к использованию реагенты (0.2 мл). Концентрации: посмотрите на этикетки. Консервант: Тимеросал 0.01%, Катон 0,1%.
- Пероксидазный (ферментный) конъюгат:** 1x12 мл готов к использованию.
- Промывочный буфер** (40x концентрат): 1x25 мл.
- ТМБ субстрат** – готов к использованию: 1x12 мл.
- Стоп раствор:** 0,25 моль серной кислоты 1x12 мл.

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ:

Хранить набор при 2 - 8°C.

Срок годности набора см. на этикетке.

### ПРЕДОСТОРОЖНОСТЬ

Для диагностики "in vitro".

Стандарты человеческого происхождения. С реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфицированными.

### МАТЕРИАЛЫ

Необходимые, но не поставляемые.

- Пипетки, способностью внесения объема 10 и 50 мкл со сменными наконечниками.
- Дистиллированная вода.
- ELISA фотометр с длиной волны 450 нм и 620-650 нм.

### СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови обычной венопункцией при соблюдении необходимых правил безопасности. Для получения точных результатов, необходима утренняя сыворотка пациента, который воздерживается от приема пищи. Кровь нужно собрать в обычную пробирку с красной полоской для венопункции, не используя никаких добавок или гелевых барьеров. Дайте возможность крови сгуститься. Центрифугируйте образец для отделения сыворотки от клеток.

Перекрытая реактивность антитела тироксина к некоторым веществам была оценена при добавлении влияющих веществ в сывороточный матрикс при разных концентрациях. Перекрытая реактивность была вычислена как соотношение между дозой влияющего вещества и дозой тироксина, необходимой для замещения того самого количества вещества, меченого атома.

### ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Приведите все реагенты, стандарты, контроли и образцы к комнатной температуре (20-27° C).

- Приготовьте ячейки микропланшета для каждого стандарта сыворотки, контроля и образца для анализа в дубликаты. Не использованные стрипы вставьте назад в алюминиевый пакет, запечатайте и храните при 2-8°C.
- Разбавьте промывочный буфер в 1л дистиллированной воды.
- Пипетируйте **10 мкл** соответствующего стандарта сыворотки, контроля или образца в помеченные ячейки в течение 10 минут!
- Инкубируйте **5 мин.** при комнатной температуре.
- Добавьте 100 мкл конъюгата пероксидазы в каждую лунку.
- Смешайте микропланшет осторожно двигая по столу (10 сек).
- Инкубируйте **80 мин.** при комнатной температуре.
- Удалите содержимое микропланшета декантацией или аспирацией.
- Для промывки наполните планшет промывочным буфером и удалите содержимое. Повторите промывку **4 раза**.
- Внесите **100 мкл** ТМБ-раствора в каждую лунку.
- Инкубируйте **10 мин.** при комнатной температуре (18-25°C). Инкубируйте **7 мин.** при комнатной температуре (26-29°C). Инкубируйте **5 мин.** при комнатной температуре (более чем 29°C).
- Добавьте 100 мкл стоп раствора в каждую лунку (в том же порядке что и раствор субстрата).
- Считайте абсорбцию каждой ячейки при 450 нм микропланшетным ридером (контрольная длина волны 620-655 нм).

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли для проверки границ уровней при гипотиреозе, эутиреозе и гипертиреозе для мониторинга характеристик анализа. Эти контроли нужно обрабатывать как неизвестные и определять значения в каждой процедуре теста. Нужно построить таблицу контроля качества для характеристик поставляемых реагентов. Для установлений тенденций, нужно использовать статистические методы изучения пациентов. Каждая лаборатория должна установить границы анализа. Другие параметры, что изучаются при исследовании отрезка 80, 50 и 20% стандартной кривой указывают на воспроизводимость между тестами. Кроме того, максимальная абсорбция не должна противоречить предыдущим результатам. Существенная девиация с установленными характеристиками может показывать изменения при экспериментальных условиях или деградации реагентов набора. Свежие реагенты должны быть использованы для определения причины вариаций.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения концентрации свободного тироксина в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

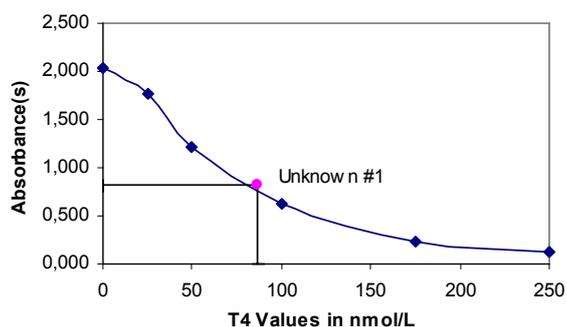
- Пометьте абсорбцию полученную с распечатки микропланшетного ридера, как указано в примере 1.
- Отметьте точками абсорбцию каждого дубликата стандартной сыворотки против соответствующей концентрации свободного Т4 в нг/дл на линейной графической бумаге (не вычисляйте среднее дубликатов стандартов сыворотки).
- Проведите оптимальную кривую через отмеченные точки.
- Для определения концентрации свободного Т4 в неизвестных образцах, отметьте среднюю абсорбцию дубликатов каждого неизвестного на вертикальной оси графика, найдите пересекающиеся точки на кривой и считайте концентрацию (в нг/дл) с горизонтальной оси графика (можно вычислить среднее дубликатов неизвестных, как указано).

В следующем примере средняя абсорбция равна 0,82 (пересекает стандартную кривую при 1,52 нг/дл концентрации свободного Т4).

## ПРИМЕР 1

Лунка	Контроли сыворотки	Абсорбция
1	0.0 нмоль/л	2.06
2	0.0 нмоль/л	2.03
3	25 нмоль/л	1.78
4	25 нмоль/л	1.74
5	50 нмоль/л	1.23
6	50 нмоль/л	1.19
7	100 нмоль/л	0.62
8	100 нмоль/л	0.64
9	175 нмоль/л	0.25
10	175 нмоль/л	0.23
11	250 нмоль/л	0.13
12	250 нмоль/л	0.12

Figure 1



Неизвестные			Среднее	
Лунка	I.D.	ОП	ОП	Значение
13	Неизвестный 1	0,81		
14	Неизвестный 1	0,83	0,82	87 нмоль/л

Наведенные данные только для иллюстрации и не могут использоваться для вычисления результатов анализа.

## ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Максимальная абсорбция (0 калибратор)  $\Rightarrow$  1,1 – 2,9.

## А. Проведение анализа

- Важно, что бы время реакции для каждой ячейки было стабильно. Пипетирование образцов не должно превышать 10 мин. Если используется более чем один планшет, необходимо строить еще одну кривую.
- Добавление раствора субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому добавление стоп раствора и субстрата нужно проводить с той самой частотой, что бы не допускать часовую девиацию во время реакции.
- Планшетный ридер измеряет вертикально. Не торкайтесь дна ячеек.
- Не правильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.
- Не должны использоваться в анализе образцы с микробиологическим загрязнением, а также высоко липемические или гемолизированные образцы.

## В. Интерпретация

- При компьютерной обработке данных для интерпретации результатов, важно, что бы вычисленные значения калибраторов не падали ниже 10% указанной концентрации.
- В общем, концентрация тироксина зависит от множества факторов: функционирования тироидной железы и ее регуляция, концентрация ТВГ и связывание тироксина с ТВГ. Поэтому, концентрация общего тироксина сама по себе не достаточна для характеристики клинического статуса.
- Значения общего тироксина в сыворотке может колебаться под влиянием таких факторов, как беременность или прием контрацептивов. Поэтому следует проводить анализ ТЗ для оценки концентрации ТВГ, что бы установить вызван ли рост Т4 вариацией ТВГ.
- Уменьшение значения общего тироксина может быть вызвано болезнями недостатка протеина, болезнями печени, приемом тестостерона или других лекарств. Таблица лекарств и условия, что влияют на величины тироксина, наведены в журнале Американской Ассоциации Клинической Химии.

Не для исследования новорожденных

## ДИАПАЗОН ОЖИДАЕМЫХ ЗНАЧЕНИЙ

Было проведено изучение эутироидной взрослой популяции для определения ожидаемых значений этого теста. Результаты наведены в Таблице 1:

Таблица 1

	Мужчины (42 образца)	Женщины (56 образцов)
Среднее	76	82
Стандартное отклонение	1,6	1,7
Ожидаемые границы	44-108	48-116

Важно помнить, что установленные границы ожидаемых значений для «нормальной» популяции зависит от многих факторов: специфичность метода, тестируемой популяции, точности метода. Поэтому, каждая лаборатория должна устанавливать собственные границы.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

## А. Точность

Внутри и между тестовая точность была определена при анализе трех разных уровней сыворотки. Полученные данные показаны в табл.

Таблица 2

Внутри тестовая точность (значения в нмоль/л)

Образец	Число	Средн.	СО	КВ, %
1	24	103,65	3,56	3,43
2	24	145,65	3,64	2,50
3	24	194,40	11,59	5,60

Таблица 3

Между тестовая точность\* (значения в нмоль/мл)

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
<b>Партия:1</b>			
X	93.57	137.2	189.15
CO	3.66	9.55	15.1
KB	3.91	6.96	7.98
<b>Партия:2</b>			
X	103.55	145.65	194.6
CO	3.56	3.64	11.59
KB	3.43	2.48	6.00
<b>Отклонение [%]</b>	<b>9.73</b>	<b>5.78</b>	<b>2.80</b>

\*Все измерения проводились в 10 экспериментах в дубликаты на протяжении 10 дней.

## В. Тщательность

Данный набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотироидной, эутироидной и гипертироидной популяции (значения в границах 8 нмоль/л – 250 нмоль/л). Общее число образцов 131. Уравнение наименьшей квадратной регрессии и коэффициент корреляции были компьютеризированы и сравнены с контрольным методом. Полученные данные отображены в Таблице 4.

Таблица 4

Метод	Средн. (x)	Анализ наименьшей квадратной регрессии	Коэффициент корреляции
Данный метод	80,7	$y=0.39+0.952(x)$	0,934
Контрольный	80,6		

Только незначительное количество показало расхождение между методами. Уравнение квадратной регрессии и коэффициент корреляции указывают на отменный метод.

## С. Чувствительность

Чувствительность набора составляет 10 нмоль/л. Чувствительность была получена исходя из вариативности 0 нмоль/л калибратора сыворотки и использования  $2\sigma$  (95% уверенность) для вычисления минимальной дозы.

## 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)