

## ИНСТРУКЦИЯ

### по применению набора реагентов для количественного определения СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА в сыворотке крови человека иммуноферментным методом (ИФА-Т4 своб.)

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения концентрации Т4 свободного (Т4 св.) в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа.

Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб, контрольной сыворотки, всего 96 определений.

Количественное определение содержания свободного тироксина в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики нарушений функции щитовидной железы.

#### ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип метода определения основан на конкуренции свободного тироксина из анализируемой пробы и конъюгата тироксина с пероксидазой за центры связывания специфичных к тироксину антител, иммобилизованных на поверхности лунок планшета. Связавшийся конъюгат выявляется ферментативной реакцией при добавлении субстрата. Интенсивность окраски обратно пропорциональна содержанию Т4 св. в пробе.

#### СОСТАВ НАБОРА

- планшет 96-луночный с отламывающимися лунками, сорбированный антителами против тироксина - 1 шт.
- калибровочные пробы, содержащие известные количества Т4 св., готовые для использования:
  - S0 (1 пробирка) 1,0 мл – 0 нг/дл
  - S1 (1 пробирка) 1,0 мл – 0,4 нг/дл
  - S2 (1 пробирка) 1,0 мл – 1,0 нг/дл
  - S3 (1 пробирка) 1,0 мл – 2,2 нг/дл
  - S4 (1 пробирка) 1,0 мл – 4,2 нг/дл
  - S5 (1 пробирка) 1,0 мл – 7,4 нг/дл
- контрольная сыворотка с известным содержанием Т4 св. (концентрация указана на пробирке), готовая для использования - 1 пробирка (0,6 мл)
- конъюгат (тироксин, конъюгированный с пероксидазой хрена), готовый для использования - 1 флакон (12 мл)
- отмывочный раствор - фосфатно-солевой буфер с добавлением твин-20 (20-кратный концентрат) – 1 флакон (50 мл)
- раствор хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), 11-кратный концентрат– 1 пробирка (1,5 мл)
- субстратный буфер, содержащий перекись водорода – 1 флакон (15 мл)
- стоп-реагент, содержащий 1 М серную кислоту, готовый для использования – 1 флакон (15 мл).

*После первого открытия реагенты стабильны в течение 2-х месяцев хранения при +4 °С.*

#### НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

- планшетный фотометр с фильтром 450 нм
- термостат или планшетный шейкер-термостат, позволяющие поддерживать температуру 18-25 °С (в случае, если температура окружающего воздуха выходит за эти пределы)
- пипетки одноканальные на 50 - 100 мкл и на 200 – 1000 мкл
- пипетка многоканальная на 100-300 мкл
- таймер
- мерный сосуд на 1000 мл
- бумага фильтровальная
- перчатки резиновые
- вода дистиллированная

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление рабочего отмывочного раствора: Концентрат отмывочного раствора развести дистиллированной водой в 20 раз. Срок хранения рабочего раствора – 1 месяц при +2 - +8°C.

*Для анализа двух стрипов: 8 мл концентрата довести до 160 мл дистиллированной водой.*

Приготовление рабочего раствора субстрата: Концентрат ТМБ развести субстратным буфером в 11 раз. (ВНИМАНИЕ: при разведении необходимо к субстратному буферу добавить ТМБ, а не наоборот).

Готовится непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

*Для анализа двух стрипов: 0,2 мл концентрата ТМБ смешать с 2 мл субстратного буфера.*

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для анализа используется сыворотка крови, также может быть использована плазма крови. Не рекомендуется использование гемолизированных или мутных образцов. Образцы до использования могут храниться не более 2 дней при 2 – 8° С. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить. Замороженные образцы после оттаивания хорошо перемешать. Исключить повторное замораживание и оттаивание.

### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Перед использованием тест-системы необходимо внимательно изучить данную инструкцию и строго соблюдать изложенные в ней требования. Производитель не несет ответственности за последствия, вызванные возможной некорректной работой тест-системы в случае несоблюдения требований инструкции.
2. Для каждого реагента и каждого этапа реакции должны быть использованы новые наконечники для пипеток.
3. Используйте только те количества реагентов, которые необходимы для данной постановки реакции. Оставшиеся неиспользованными растворы категорически запрещается переливать обратно во флаконы с исходными реагентами.
4. Субстратный буфер и ТМБ, а также рабочий раствор субстрата чувствительны к свету. Необходимо также исключить контакт этих растворов с окислителями, такими, как хлорсодержащие моющие средства и металлы.
5. Тестируемые образцы должны рассматриваться как потенциально инфекционный материал и при работе с ними и последующей утилизации необходимо руководствоваться утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.
6. ТМБ и рабочий раствор субстрата, а также стоп-реагент могут вызывать раздражение кожи и слизистых поверхностей при попадании на них. В этом случае необходимо обильно промыть водой место контакта и обратиться за медицинской помощью.

### ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Выдержать набор при комнатной температуре (приблизительно 30 мин). Пакет с планшетом не открывать!
2. Встряхнуть все компоненты набора.
3. Извлечь планшет из пакета. Определить необходимое количество лунок (количество образцов + 7) x 2. Неиспользованные стрипы поместить обратно в пакет и плотно закрыть (пакетик с поглотителем влаги должен оставаться внутри).
4. Внести в соответствующие лунки (в дубликатах) по 50 мкл каждого калибратора, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.
5. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата. Общее время внесения на весь планшет калибровочных проб, контрольной сыворотки, анализируемых образцов и раствора конъюгата не должно превышать 10 мин.
6. Заклеить планшет липкой лентой. Осторожно вращать планшет по поверхности стола в течение 10 – 15 сек для смешивания растворов.
7. Инкубировать 60 мин при комнатной температуре (18 – 25 ° С).
8. Удалить жидкость из лунок и промыть 5 раз рабочим отмывочным раствором, внося в каждую лунку по 300 мкл. Удалить остатки раствора постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
9. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора субстрата.
10. Инкубировать в темном месте при комнатной температуре (18 – 25 ° С) в течение 15 - 20 мин.

11. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента для остановки реакции. Соблюдать ту же последовательность добавления стоп-реагента, что и при внесении раствора субстрата. Осторожно вращать планшет по поверхности стола в течение 10 – 15 сек для смешивания растворов.
12. Провести измерение оптической плотности на фотометре с фильтром 450 нм в течение 15 мин после остановки реакции.

### ЗАМЕЧАНИЯ

1. В процессе постановки реакции необходимо предотвращать подсыхание лунок планшета и попадание на них яркого света и солнечных лучей.
2. Для получения качественных результатов необходимо аккуратное и полное удаление отмывочного раствора.
3. Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации, необходимо все реагенты, особенно стоп-реагент, вносить в лунки в той же последовательности с той же скоростью, что и предыдущие реагенты.
4. Не касаться дна лунок.

### РАСЧЕТЫ

1. Рассчитать средние арифметические значения показателей оптической плотности калибраторов, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

2. Построить в линейных координатах калибровочную кривую зависимости оптической плотности (ось Y) от концентрации T4 св. в калибровочных пробах (ось X). Соединить полученные точки прямыми линиями.

3. При построении калибровочной кривой и определении T4 свободного в исследуемых образцах с помощью автоматического анализатора рекомендуется использовать кусочно-линейный метод аппроксимации.

4. Построение калибровочной кривой необходимо при каждой постановке реакции.

### РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Ориентировочные значения уровня T4 св. в сыворотке в норме по данным МОНИИАГ.

Возрастная группа	Единицы СИ
Взрослые:	11,5-23,0 пмоль/л (0,9-1,8 нг/дл)
Беременные:	
1 триместр	13,8-24,3 пмоль/л (1,08-1,9 нг/дл)
2 триместр	10,3-19,4 пмоль/л (0,8-1,5 нг/дл)
3 триместр	7,95-19,0 пмоль/л (0,6-1,5 нг/дл)

*Тест-система не предназначена для определения T4 свободного у новорожденных.*

Каждая лаборатория должна на контингенте своего региона определить свои референсные значения нормы T4 св.

**Коэффициент перевода: 1 нг/дл=12,87 пмоль/л; 1 пмоль/л=0,078 нг/дл**

### АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

1. Чувствительность набора составляет 0,05 нг/дл – минимально определяемая концентрация T4 св., рассчитанная на основании вариабельности калибровочной пробы S 0, содержащей 0 нг/дл T4 св. и определения 2 SD (среднее квадратическое отклонение от среднего арифметического значения S 0) нг/дл.
2. Воспроизводимость внутрисерийная установлена на основании исследования пула контрольных сывороток с различным содержанием T4 свободного.

Образцы, содержащие различные уровни T4 свободного	Кол-во повторов	Среднее значение нг/дл	SD	CV%
Низкий	16	0,3	0,03	7,8
Нормальный	16	1,4	0,06	4,5
Высокий	16	3,6	0,22	6,2

3. Воспроизводимость межсерийная установлена на основании исследования пула контрольных сывороток с различным содержанием T4 свободного.

Образцы, содержащие различные уровни T4 свободного	Кол-во повторов	Среднее значение нг/дл	SD	CV%
--	-----------------	------------------------	----	-----

Низкий	10	0,34	0,04	9,8
Нормальный	10	1,35	0,07	3,7
Высокий	10	3,69	0,25	4,2

## 4. Специфичность.

Вещество	Перекрестная реактивность	Концентрация
l-Тироксин	1.0000	-
d-Тироксин	0,9800	10 нг/дл
d-Трийодтиронин	0,0150	100нг/дл
l-Трийодтиронин	0,0300	100 нг/дл
Йодотирозин	0,0001	100 мкг/мл
Дийодотирозин	0,0001	100 мкг/мл
Дийодотиронин	0,0001	100 мкг/мл

5. Проводилось сравнение результатов, полученных с использованием данного набора с радиоиммунным методом. Использовались биологические пробы от лиц с различным содержанием Т4 свободного (0,1-8,0 нг/дл). Общее количество образцов – 85. Коэффициент корреляции составил 0,978.

## Краткая схема проведения анализа

**Необходимое количество лунок: (количество образцов + 7) x 2**

**Внести:**

Стандарты S <sub>0</sub> – S <sub>5</sub> , образцы, контрольная сыворотка	50 мкл
Конъюгат	100 мкл

**Инкубация 1 час при комнатной температуре**

***Отмывка 5 раз (300 мкл./ лунка) отмывочным раствором***

**Внести 100 мкл рабочего раствора субстрата**

**Инкубация 15 - 20 мин при комнатной температуре в темноте**

**Внести 100 мкл стоп-реагента**

**Измерение ОП при длине волны 450 нм**

**ВНИМАНИЕ!** Прежде, чем пользоваться данной схемой, внимательно ознакомьтесь с полной инструкцией к тест-системе