



**IN VITRO RADIOIMUNOANALYTICKÉ STANOVENÍ  
CELKOVÉHO TYROXINU (TT4) V LIDSKÉM SÉRU A PLAZMĚ**



**1. PRINCIP METODY**

Radioimunoanalytické stanovení celkového tyroxinu (TT4) je kompetitivní stanovení. Neznámé vzorky a kalibrátory se inkubují spolu se <sup>125</sup>I-tyroxinem jako radioindikátorem ve zkumavkách potažených protilátkou. Po inkubaci se obsah zkumavek odšaje a navázaná aktivita se změřá gama-čítačem. Sestrojí se kalibrační křivka a z ní se odečtou koncentrace TT4 v neznámých vzorcích.

**2. REAGENCIE**

Všechny reagenty v soupravě jsou stabilní do data expirace, uvedeného na štítku krabice, jestliže jsou skladovány při 2-8 °C. Skladovací podmínky pro rekonstituované reagenty jsou uvedeny v kapitole 6. Postup stanovení.

**2.1 Souprava pro stanovení TT4, 100 zkumavek (Kat. č. 1447)**

**2.1.1 Zkumavky potažené protilátkou proti tyroxinu: 2x 50 kusů; připraveny k použití.**

**2.1.2 <sup>125</sup>I-tyroxin: 1 lahvička (55 mL);** připraven k použití. Lahvička obsahuje ke dni výroby 110 kBq <sup>125</sup>I značeného T4 v roztoku s proteiny, azidem sodným (<0,1%, viz kap. Upozornění) a barvivem.

**2.1.3 Kalibrátory: 6 lahviček (po 0,5 mL);** připraveny k použití. Lahvičky obsahují od 0 do 400 nmol/L tyroxinu, v lidském séru s azidem sodným (<0,1%, viz kap. Upozornění). Přesné koncentrace jsou uvedeny na štítkách lahviček. Lahvičky s kalibrátory musí být vždy po naplpetování příslušných roztoků **ihned uzavřeny a uloženy** při 2-8 °C. V opačném případě může dojít k odpaření roztoků a následně při příštím stanovení ke zkreslení výsledků. Kalibrátory jsou kalibrovány na standard IRMM-468.

**2.1.4 Kontrolní vzorky: 2 lahvičky; lyofilizáty.** Lahvičky obsahují T4, lyofilizovaný v lidském séru (viz kap. Upozornění). Koncentrační rozsah očekávaných hodnot je uveden v příloze návodu. Lahvičky musí být vždy po naplpetování příslušných roztoků **ihned uzavřeny a uloženy** podle bodu 6.1. V opačném případě může dojít k odpaření roztoků a následně při příštím stanovení ke zkreslení výsledků.

**2.2 Souprava pro stanovení TT4, 400 zkumavek (Kat. č. 3286)**

**2.2.1 Zkumavky potažené protilátkou proti tyroxinu: 8x 50 kusů; připraveny k použití.**

**2.2.2 <sup>125</sup>I-tyroxin: 4 lahvičky (po 55 mL);** připraveny k použití.

**2.2.3 Kalibrátory: 6 lahviček (po 0,5 mL);** připraveny k použití.

**2.2.4 Kontrolní vzorky: 2 lahvičky; lyofilizáty.**

*Upozornění: Teplota a data expirace uvedené na lahvičkách se týkají pouze dlouhodobého skladování komponent u výrobce, před jejich vložením do soupravy. Neberte na ně tedy, prosím, ohled.*

**3. ZAŘÍZENÍ A POTŘEBNÝ MATERIÁL**

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

- přesná mikropipeta (20 µL),
- poloautomatická pipeta (500 µL),
- vibrační míchadlo,
- horizontální nebo orbitální třepačka,
- vývěva,
- gama-čítač kalibrován na <sup>125</sup>I.

**4. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ**

**4.1 Obecné poznámky:**

- nechejte reagenty před pipetací vytemperovat na lab. teplotu,
- nemíchejte substance ze souprav různých šarží,
- ke každé řadě stanovení je třeba vždy stanovit novou kalibrační závislost,
- přesné nastavení třepačky je důležité pro reprodukovatelnost stanovení,
- doporučuje se provádět stanovení v duplikátech,
- zkumavky jsou pouze na jedno použití,
- veškerý odpad je třeba likvidovat v souladu s příslušným zákonem.

**4.2 Základní pravidla radiační bezpečnosti**

Tato souprava obsahuje méně než 110 kBq <sup>125</sup>I ke dni výroby. Tento radioaktivní materiál mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracovníci, která splňují platné zákonné předpisy upravující podmínky pro bezpečné nakládání s olověnými radionuklidovými zářiči.

Při práci s radioaktivními látkami dodržujte následující pravidla:

- všechny radioaktivní látky musí být skladovány v původním balení a jen na místech k tomu určených,
- příjem a spotřeba radioaktivních látek musí být evidována,
- práce s radioaktivními látkami musí být prováděny pouze ve vyhrazených prostorách,
- pipetování nesmí být prováděno ústy,
- v laboratořích určených k práci s radioaktivními látkami je zakázáno jíst, pít, kouřit, lícit se a pod.,
- zabraňte přímému styku radioaktivních látek s pokožkou a používejte ochranných oděvů a rukavic. Po skončení práce s těmito látkami si vždy umyjte ruce,
- obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek,
- povrch pracovních stolů, který by mohl být kontaminován, je třeba pravidelně kontrolovat,
- v případě kontaminace nebo úniku radioaktivního materiálu postupujte podle stanovených předpisů
- všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami musí být řádně dekontaminováno a proměřeno před dalším použitím.

**4.3 Azid sodný**

Některé substance jsou konzervovány azidem sodným. Azid sodný může reagovat s olovem, mědí nebo mosazí za vzniku příslušných výbušných azidů. Proto likvidované reagenty splachujte velkým množstvím vody.

**4.4 Lidské sérum**

Materiál lidského původu obsažený v reagentech této soupravy měl negativní test na přítomnost protilátek proti viru HIV 1 a 2, viru hepatitidy C a proti povrchovému antigenu hepatitidy B (HBsAg). Žádná z dostupných metod nemůže dát sto procentní jistotu neinfekčnosti. Je tedy nutné pracovat s těmito reagenty jako s potenciálně infekčními.

Se všemi vzorky séra a plazmy musí být manipulováno, jako s potenciálně infekčními (hepatitis, nebo AIDS). Veškerý vzniklý odpad je třeba likvidovat podle platných předpisů.

**5. SBĚR A PŘÍPRAVA, SKLADOVÁNÍ A ŘEDĚNÍ VZORKŮ**

- Odebírejte vzorky krve do zkumavek bez aditiv nebo s EDTA nebo heparinem.
- Odstředěním oddělte sérum nebo plazmu.
- Vzorky séra a plazmy lze skladovat při 2-8 °C, jestliže bude stanovení provedeno do 24 hodin. Při delším skladování je nutno vzorky zamrazit při <-18 °C nejlépe v alikvotech, aby se předešlo opakovanému rozmrazování a zmrazování.

**6. POSTUP STANOVENÍ**

**6.1. Příprava kontrolních vzorků**

Po vytemperování na laboratorní teplotu se obsah lahviček rozpustí v destilované vodě, jejíž objem je uveden na štítku lahvičky. Po přidání vody nechte kontrolní vzorky volně rozpouštět 10 minut a potom lehce bez napěnění promíchejte. Rozpuštěné kontrolní vzorky je možno skladovat 1 týden při 2-8 °C nebo v alikvotech zmrazené při <-18 °C do data expirace soupravy. Zabraňte opakovanému zmrazení a rozmrazení.

**6.2 Schéma postupu (viz tabulka uvedená na další straně)**

**7. VÝSLEDKY**

Výsledky jsou získány proložením z kalibrační křivky. Křivka slouží k určení koncentrace TT4 pouze ve vzorcích měřených současně s kalibrátory.

### 7.1 Kalibrační křivka

Výsledky uvedené v návodu byly získány v logit-log zobrazení (s použitím vážené kubické regrese). Na vertikální osu bylo vyneseno B/T (%) nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální osu byly vyneseny koncentrace TT4 v kalibrátorech (nmol/L). Jiné metody zpracování mohou dávat mírně odlišné výsledky.

Total cpm: 44 140 cpm				
Kalibrátor	TT4 (nmol/L)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	34 959	77,2	100
1	26	31 590	71,8	90,4
2	53	26 213	59,4	75,0
3	105	17 048	38,6	48,8
4	210	9 727	22,0	27,8
5	420	5 487	11,8	14,8

(Příklad typického stanovení, nepoužívejte pro výpočet.)

### 7.2 Vzorok

Na vertikální ose lokalizujte pro každý vzorek hodnoty B/T nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální ose odečtěte odpovídající koncentrace TT4 v nM.

Přepočít koncentrací z nmol/L (nM) na ng/dL se provede vynásobením výsledků faktorem 77,7.

## 8. KONTROLA KVALITY

Správná laboratorní praxe předpokládá, že se kontrolní vzorek používá v každé kalibraci, aby se zajistila kontrola kvality získaných výsledků. Kontrolní vzorky musí být zpracovány stejným způsobem jako neznámé vzorky a k vyhodnocení výsledků se mají použít vhodné statistické metody.

V případě závažného poškození obalu, nebo jestliže získané výsledky nejsou ve shodě s analytickými parametry stanovení (viz kap. 10), kontaktujte prosím naše odborné pracovníky. Tel.: +420 272 017 391; fax: +420 272 017 385; E-mail: [imunochem@beckmancoulter.com](mailto:imunochem@beckmancoulter.com)

## 9. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní rozmezí referenčních hodnot. U neléčených eutyreoidních osob byla touto soupravou stanovena normální oblast koncentrace celkového tyroxinu v rozmezí 60-160 nmol/L.

## 10. ANALYTICKÉ PARAMETRY STANOVENÍ

(podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX")

### 10.1 Citlivost

10.1.1 Analytická citlivost: 13 nmol/L

10.1.2 Funkční citlivost: 16,7 nmol/L

### 10.2 Specifita

Protilátka použitá v systému je vysoce specifická pro tyroxin. Ostatní přirozeně se vyskytující hormony (D-T3, L-T3 aj.) dávají extrémně nízkou zkříženou reakci.

### 10.3 Přesnost

#### 10.3.1 Intra-assay

Přesnost intra-assay byla stanovena 10krát opakovanou analýzou. Hodnota variačního koeficientu byla menší nebo rovna 6,2%.

#### 10.3.2 Inter-assay

Vzorky byly analyzovány duplikátech v 10 nezávislých analýzách. Hodnota variačního koeficientu byla menší nebo rovna 8,6%.

### 10.4 Správnost

#### 10.4.1 Test ředění

10 sérových vzorků se zvýšenou koncentrací bylo postupně ředěno nulovým kalibrátorem. Výsledky byly podrobeny regresní analýze:

$$y = 1,096x - 7,290; \quad r = 0,987 (n = 30),$$

kde  $x$  - teoretická koncentrace

$y$  - stanovená koncentrace

#### 10.4.2 Recovery test

K 10 sérovým vzorkům s nízkou koncentrací T4 byla přidána známá množství T4. Výsledky byly podrobeny regresní analýze:

$$y = 1,050x - 1,834; \quad r = 0,993 (n = 40),$$

kde  $x$  - teoretická koncentrace

$y$  - stanovená koncentrace

### 10.5 Rozsah stanovení (od analytické citlivosti do nejvyššího kalibrátoru):

13 - 400 nM.

## 11. OMEZENÍ POUŽITÍ SOUPRAVY

Nedodržení instrukcí uvedených v tomto návodu může vést k nesprávným výsledkům.

Výsledky stanovení by měly být interpretovány ve světle celkového klinického obrazu pacienta včetně anamnézy, údajů z dalších testů a jiných vhodných informací.

U stanovení využívajících protilátky existuje možnost interference heterofilních protilátek přílovných v patientském vzorku. Pacienti, kteří byli pravidelně ve styku se zvířaty nebo podstoupili imunoterapii nebo diagnostické procedury využívající imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinů, mohou produkovat protilátky jako například HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies - lidské protilátky proti myším proteinům), které interferují při imunologických stanoveních.

Takové interferující protilátky mohou vést k chybným výsledkům. Výsledky pacientů, u nichž existuje podezření na přítomnost takovýchto protilátek, posuzujte s opatrností.

## 6. SCHÉMA POSTUPU STANOVENÍ

Krok 1 Pipetace*	Krok 2 Inkubace	Krok 3 Měření
Do potažených zkumavek postupně přidejte:  -20 $\mu$ L kalibrátoru, kontrolního nebo neznámého vzorku a -500 $\mu$ L radioindikátoru.  Promíchejte.	Inkubujte 1 hod. při 18-25 °C, za stálého třepání (>280 kmitů/min.).	Opatrně odsajte obsah každé zkumavky (s výjimkou 2 zkumavek pro „total“).  Měřte po dobu 1 min. vázanou aktivitu (B) a celkovou aktivitu (T).

\* Napipetujte po 500  $\mu$ L radioindikátoru do 2 nepotažených zkumavek pro zjištění celkové aktivity (T).



**IN VITRO RADIOIMUNOANALYTICKÉ STANOVENÍ  
CELKOVÉHO TRIJODTYRONINU V LIDSKÉM SÉRU A PLAZMĚ**



**1. PRINCIP METODY**

Radioimunoanalytické stanovení celkového trijodtyroninu (TT3) je kompetitivní stanovení. Neznámé vzorky a kalibrátory se inkubují spolu se <sup>125</sup>I-trijodtyroninem jako radioindikátorem ve zkumavkách potažených protilátkou. Po inkubaci se obsah zkumavek odsaje a navázaná aktivita se změřit gama-čítačem. Sestrojí se kalibrační křivka a z ní se odečtou koncentrace TT3 v neznámých vzorcích.

**2. REAGENCIE**

Všechny reagenty v soupravě jsou stabilní do data expirace, uvedeného na štítku krabice, jestliže jsou skladovány při 2-8 °C. Skladovací podmínky pro rekonstituované reagenty jsou uvedeny v kapitole 6. Postup stanovení.

**2.1 Souprava pro stanovení TT3, 100 zkumavek (Kat. č. 1699)**

**2.1.1 Zkumavky potažené protilátkou proti trijodtyroninu: 2x 50 kusů; připraveny k použití.**

**2.1.2 <sup>125</sup>I-trijodtyronin: 1 lahvička (22 mL); připraven k použití.**

Lahvička obsahuje ke dni výroby 165 kBq <sup>125</sup>I značeného T3 v tlumivém roztoku s proteiny, azidem sodným (<0,1%, viz kap. Upozornění) a barvivem. Poznámka: Případný výskyt sraženiny v radioindikátoru nemá vliv na kvalitu stanovení.

**2.1.3 Kalibrátory: 6 lahviček (po 0,5 mL); připraveny k použití.**

Lahvičky obsahují od 0 do 12 nmol/L trijodtyroninu, v lidském séru s azidem sodným (<0,1%, viz kap. Upozornění). Přesné koncentrace jsou uvedeny na štítcích lahviček. Lahvičky se kalibrátory musí být vždy po napipetování příslušných roztoků **ihned uzavřeny a uloženy** při 2-8 °C. V opačném případě může dojít k odpaření roztoků a následně při příštím stanovení ke zkreslení výsledků. Kalibrátory jsou kalibrovány na standard IRMM-469.

**2.1.4 Kontrolní vzorky: 2 lahvičky; lyofilizáty.**

Lahvičky obsahují trijodtyronin, lyofilizovaný v lidském séru (viz kap. Upozornění). Koncentrační rozsah očekávaných hodnot je uveden v příloze návodu. Lahvičky musí být vždy po napipetování příslušných roztoků **ihned uzavřeny a uloženy** podle bodu 6.1. V opačném případě může dojít k odpaření roztoků a následně při příštím stanovení ke zkreslení výsledků.

**2.2 Souprava pro stanovení TT3, 400 zkumavek (Kat. č. 3287)**

**2.2.1 Zkumavky potažené protilátkou proti trijodtyroninu: 8x 50 kusů; připraveny k použití.**

**2.2.2 <sup>125</sup>I-trijodtyronin: 4 lahvičky (po 22 mL); připraveny k použití.**

**2.2.3 Kalibrátory: 6 lahviček (po 0,5 mL); připraveny k použití.**

**2.2.4 Kontrolní vzorky: 2 lahvičky; lyofilizáty.**

*Upozornění: Teplota a data expirace uvedené na lahvičkách se týkají pouze dlouhodobého skladování komponent u výrobce, před jejich vložením do soupravy. Neberte na ně tedy, prosím, ohled.*

**3. ZAŘÍZENÍ A POTŘEBNÝ MATERIÁL**

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

- přesná mikropipeta (25 µL),
- poloautomatická pipeta (200 µL),
- vibrační míchadlo,
- horizontální nebo orbitální třepačka,
- vývěva,
- gama-čítač kalibrován na <sup>125</sup>I.

**4. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ**

**4.1 Obecné poznámky:**

- nechejte reagenty před pipetací vytemperovat na lab. teplotu,
- nemíchejte substance ze souprav různých šarží,
- ke každé řadě stanovení je třeba vždy stanovit novou kalibrační závislost,
- přesné nastavení třepačky je důležité reprodukovatelnosti stanovení,
- doporučuje se provádět stanovení v duplikátech.
- Zkumavky jsou pouze na jedno použití.
- veškerý odpad je třeba likvidovat v souladu s příslušným zákonem.

**4.2 Základní pravidla radiační bezpečnosti**

Tato souprava obsahuje méně než 165 kBq (4x 165 kBq) <sup>125</sup>I ke dni výroby. Tento radioaktivní materiál mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracovníci, která splňují platné zákonné předpisy upravující podmínky pro bezpečné nakládání s otevřenými radionuklidovými zařízeními.

Při práci s radioaktivními látkami dodržujte následující pravidla:

- všechny radioaktivní látky musí být skladovány v původním balení a jen na místech k tomu určených,
- příjem a spotřeba radioaktivních látek musí být evidována,
- práce s radioaktivními látkami musí být prováděny pouze ve vyhrazených prostorách,
- pipetování nesmí být prováděno ústy,
- v laboratorních určených k práci s radioaktivními látkami je zakázáno jíst, pít, kouřit, líčit se a pod.,
- zabraňte přímému styku radioaktivních látek s pokožkou a používejte ochranných oděvů a rukavic. Po skončení práce s těmito látkami si vždy umyjte ruce,
- obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek,
- povrch pracovních stolů, který by mohl být kontaminován, je třeba pravidelně kontrolovat,
- v případě kontaminace nebo úniku radioaktivního materiálu postupujte podle stanovených předpisů
- všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami musí být řádně dekontaminováno a proměněno před dalším použitím.

**4.3 Azid sodný**

Některé substance jsou konzervovány azidem sodným. Azid sodný může reagovat s olovem, mědí nebo mosazi za vzniku příslušných výbušných azidů. Proto likvidované reagenty splachujte velkým množstvím vody.

**4.4 Lidské sérum**

Materiál lidského původu obsahující viru HIV 1 a 2, viru hepatitidy C a proti povrchovému antigenu hepatitidy B (HBsAg). Žádná z dostupných metod nemůže dát stoprocentní jistotu neinfekčnosti. Je tedy nutné pracovat s těmito reagenty jako s potenciálně infekčními.

Se všemi vzorky séra a plazmy musí být manipulováno, jako s potenciálně infekčními (hepatitis, nebo AIDS). Veškerý vzniklý odpad je třeba likvidovat podle platných předpisů.

**5. SBĚR A PŘÍPRAVA, SKLADOVÁNÍ A ŘEDĚNÍ VZORKŮ**

- Odebírejte vzorky krve do zkumavek bez aditiv nebo s EDTA nebo heparinem.
- Odstředěním oddělte sérum nebo plazmu.
- Vzorky séra a plazmy lze skladovat při 2-8 °C, jestliže bude stanovení provedeno do 24 hodin. Při delším skladování je nutno vzorky zamrazit při <-18 °C, nejlépe v alikvotech, aby se předešlo opakovanému rozmrazování a zmrazování.

**6. POSTUP STANOVENÍ**

**6.1 Příprava kontrolních vzorků**

Po vytemperování na laboratorní teplotu se obsah lahviček rozpustí v destilované vodě, jejíž objem je uveden na štítku lahvičky. Po přidání vody nechte kontrolní vzorky volně rozpouštět 10 minut a potom lehce bez napěnění promíchejte. Rozpuštěné kontrolní vzorky je možno skladovat 1 týden při 2-8 °C nebo v alikvotech zamrazené při <-18 °C do data expirace soupravy.

**6.2 Schéma postupu (viz tabulka uvedená na další straně)**

**7. VÝSLEDKY**

Výsledky jsou získány proložením z kalibrační křivky. Křivka slouží k určení koncentrace TT3 pouze ve vzorcích měřených současně s kalibrátory.

**7.1 Kalibrační křivka**

Výsledky uvedené v návodu byly získány v logit-log zobrazení (spline). Na vertikální osu bylo vyneseno B/T (%) nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální osu byly vyneseny koncentrace TT3 v kalibrátorech (nmol/L). Jiné metody zpracování mohou dávat mírně rozdílné výsledky.

Total cpm: 55 739 cpm				
Kalibrátor	TT3 (nmol/L)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	41 993	75,3	100,0
1	0,75	33 375	59,9	79,5
2	1,5	24 922	44,7	59,3
3	3,0	15 480	27,8	36,9
4	6,0	8 930	16,0	21,3
5	12,0	5 128	9,2	12,2

(Příklad typického stanovení, nepoužívejte pro výpočet.)

## 7.2 Vzorky

Na vertikální ose lokalizujte pro každý vzorek hodnoty B/T nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální ose odečtete odpovídající koncentrace TT3 v nM.

Přepočet koncentrací z nM na ng/dL se provede vynásobením výsledků faktorem 65.

## 8. KONTROLA KVALITY

Správná laboratorní praxe předpokládá, že se kontrolní vzorek používá v každé kalibraci, aby se zajistila kontrola kvality získaných výsledků. Kontrolní vzorky musí být zpracovány stejným způsobem jako neznámé vzorky a k vyhodnocení výsledků se mají použít vhodné statistické metody.

V případě závažného poškození obalu, nebo jestliže získané výsledky nejsou ve shodě s analytickými parametry stanovení (viz kap. 10), kontaktujte prosím naše odborné pracovníky. Tel.: +420 272 017 391; fax: +420 272 017 385;

E-mail: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## 9. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní rozmezí referenčních hodnot. U neléčených eutyroidních osob byla touto soupravou stanovena normální oblast koncentrace celkového trijodtyroninu v rozmezí 1,2 – 2,8 nmol/L.

## 10. ANALYTICKÉ PARAMETRY STANOVENÍ

(podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX")

### 10.1 Citlivost

10.1.1 Analytická citlivost: 0,3 nmol/L

10.1.2 Funkční citlivost: 0,5 nmol/L

### 10.2 Specifita

Protilátka použitá v systému je vysoce specifická pro trijodtyronin. Ostatní přirozeně se vyskytující hormony (reversní-T3, L-T4, D-T4 aj.) dávají extrémně nízkou zkříženou reakci.

### 10.3 Přesnost

#### 10.3.1 Intra-assay

Přesnost intra-assay byla stanovena 10krát opakovanou analýzou. Hodnota variačního koeficientu byla menší nebo rovna 6,3%.

#### 10.3.2 Inter-assay

Vzorky byly analyzovány duplikátech v 10 nezávislých analýzách. Hodnota variačního koeficientu byla menší nebo rovna 7,7%.

### 10.4 Správnost

#### 10.4.1 Test ředění

Vzorky s vysokou koncentrací byly postupně ředěny a analyzovány. Naměřené hodnoty „recovery“ se pohybovaly v rozmezí 90% až 110%.

#### 10.4.2 Recovery test

Ke vzorkům s nízkou hladinou TT3 byla přidána různá známá množství TT3 a vzorky byly analyzovány. Naměřené hodnoty „recovery“ se pohybovaly v rozmezí 93% až 106%.

### 10.5 Rozsah stanovení (od analytické citlivosti do nejvyššího kalibrátoru): 0,3 – 12 nmol/L.

## 11. OMEZENÍ POUŽITÍ SOUPRAVY

Nedodržení instrukcí uvedených v tomto návodu může vést k nesprávným výsledkům. Výsledky stanovení by měly být interpretovány ve světle celkového klinického obrazu pacienta včetně anamnézy, údajů z dalších testů a jiných vhodných informací.

U stanovení využívajících protilátky existuje možnost interference heterofilních protilátek přítomných v patientském vzorku. Pacienti, kteří byli pravidelně ve styku se zvířaty nebo podstoupili imunoterapii nebo diagnostické procedury využívající imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinů, mohou produkovat protilátky jako například HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies - lidské protilátky proti myším proteinům), které interferují při imunologických stanoveních.

Takové interferující protilátky mohou vést k chybným výsledkům. Výsledky pacientů, u nichž existuje podezření na přítomnost takovýchto protilátek, posuzujte s opatrností.

## 6. SHÉMA POSTUPU STANOVENÍ

Krok 1 Pipetace*	Krok 2 Inkubace	Krok 3 Měření
Do potažených zkumavek postupně přidejte: -25 µL kalibrátoru, kontroly nebo vzorku a -200 µL radioindikátoru. Promíchejte.	Inkubujte 1 hod. při 18-25 °C, za stálého třepání (>280 kmitů/min).	Opatrně odsajte obsah každé zkumavky (s výjimkou 2 zkumavek pro „total“). Měřte po dobu 1 min. vázanou aktivitu (B) a celkovou aktivitu (T).

\*Napipetujte po 200 µL radioindikátoru do 2 nepotažených zkumavek pro zjištění celkové aktivity (T).



IVD

FT4 RIA KIT

REF

IM1363 - IM3321

**ISO 9001**  
**13485**  
certified

**IN VITRO RADIOIMUNOANALYTICKÉ STANOVENÍ  
VOLNÉHO TYROXINU V LIDSKÉM SÉRU A PLAZMĚ**



**1. PRINCIP METODY**

Radiomunoanalytické stanovení volného tyroxinu (FT4) je kompetitivní stanovení založené na použití protilátky proti tyroxinu značené <sup>125</sup>I. Neznámé vzorky a standardy se spojují s touto značenou protilátkou a biotinylovaným analogem tyroxinu (ligandem) inkubují ve zkumavkách potažených avidinem. Probíhá tak kompetice mezi volným tyroxinem ve vzorku a ligandem o vazebná místa na protilátce. Ta část protilátky, která je vázána na ligand, se naváže na stěny zkumavek, protože ligand je biotinylován. Po inkubaci se obsah zkumavek odsaje a změní se vázaná radioaktivita. Množství radioaktivní, vázané po inkubaci na stěny, je pak nepřímě úměrné množství volného tyroxinu ve vzorku. Sestrojí se kalibrační křivka a z ní se odečtou koncentrace FT4 v neznámých vzorcích.

**2. REAGENCIE**

Všechny reagenty v soupravě jsou stabilní do data expirace, uvedeného na štítku krabice, jestliže jsou skladovány při 2-8 °C. Skladovací podmínky pro rekonstruované reagenty jsou uvedeny v kapitole 6. Postup stanovení.

**2.1 Souprava pro stanovení FT4, 100 zkumavek (Kat. č. 1363)**

**2.1.1 Zkumavky potažené avidinem: 2x 50 kusů; připraveny k použití.**

**2.1.2 Monoklonální protilátka proti tyroxinu, značená <sup>125</sup>I: 1 lahvička (45 mL);** připravena k použití.  
Lahvička obsahuje ke dni výroby 310 kBq <sup>125</sup>I značeného imunoglobulinu v pufru s ochrannými hovězími proteiny, azidem sodným (<0,1%, viz kap. Upozornění) a barvivem.

**2.1.3 Kalibrátory: 5 lahviček (po 0,5 mL); připraveny k použití.**  
Lahvičky obsahují od 0 do 75 pmol/L volného tyroxinu, v lidském séru s azidem sodným (<0,1%, viz kap. Upozornění). Přesné koncentrace jsou uvedeny na štítkech lahviček. Lahvičky s kalibrátory musí být vždy po napipetování příslušných roztoků **ihned uzavřeny a uloženy** při 2-8 °C. V opačném případě může dojít k odpaření roztoků a následně při příštím stanovení ke zkreslení výsledků. Hodnoty kalibrátorů byly nastaveny pomocí vnitřního referenčního materiálu.

**2.1.4 Ligand: 1 lahvička (12 mL); připraven k použití.**  
Lahvička obsahuje roztok biotinylovaného analogu T4 s ochrannými proteiny a azidem sodným (<0,1%, viz kap. Upozornění).

**2.1.5 Kontrolní vzorek: 1 lahvička; lyofilizát.**  
Lahvička obsahuje T4, lyofilizovaný v lidském séru (viz kap. Upozornění). Koncentrační rozsah očekávaných hodnot je uveden v příloze návodu. Lahvičky musí být vždy po napipetování příslušných roztoků **ihned uzavřeny a uloženy** podle bodu 6.1. V opačném případě může dojít k odpaření roztoků a následně při příštím stanovení ke zkreslení výsledků.  
Upozornění: Ověřte, zda v reagentech není sraženina; roztok protilátky by měl být čirý a modrozelený, roztoky kalibrátorů mohou být opalescentní a roztok ligandu má být čirý a bezbarvý.

**2.2 Souprava pro stanovení FT4, 400 zkumavek (Kat. č. 3321)**

**2.2.1 Zkumavky potažené avidinem: 8x 50 kusů; připraveny k použití.**

**2.2.2 Monoklonální protilátka proti tyroxinu, značená <sup>125</sup>I: 4 lahvičky (po 45 mL);** připraveny k použití.

**2.2.3 Kalibrátory: 5 lahviček (po 0,5 mL); připraveny k použití.**

**2.2.4 Ligand: 4 lahvičky (po 12 mL); připraveny k použití.**

**2.2.5 Kontrolní vzorek: 1 lahvička; lyofilizát.**

*Upozornění: Teplota a data expirace uvedené na lahvičkách se týkají pouze dlouhodobého skladování komponent u výrobce, před jejich vložením do soupravy. Neberte na ně tedy, prosím, ohled.*

**3. ZAŘÍZENÍ A POTŘEBNÝ MATERIÁL**

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

- přesná mikropipeta (25 µL),
- poloautomatická pipeta (100 µL a 400 µL),
- vibrační míchadlo,
- horizontální nebo orbitální třepačka,
- vývěva,
- gama-čítač kalibrovaný na <sup>125</sup>I.

**4. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ**

**4.1 Obecné poznámky:**

- nechejte reagenty před pipetací vytemperovat na lab. teplotu,
- nemíchejte substance ze souprav různých šarží,
- ke každé řadě stanovení je třeba vždy stanovit novou kalibrační závislost,
- přesné nastavení třepačky je důležité pro reprodukovatelnost stanovení,
- doporučuje se provádět stanovení v duplikátech.
- zkumavky jsou pouze na jedno použití,
- veškerý odpad je třeba likvidovat v souladu s příslušným zákonem.

**4.2 Základní pravidla radiační bezpečnosti**

Tato souprava obsahuje méně než 310 kBq <sup>125</sup>I ke dni výroby. Tento radioaktivní materiál mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracovníci, kteří splňují platné zákonné předpisy upravující podmínky pro bezpečné nakládání s otevřenými radionuklidovými zařízeními.

Při práci s radioaktivními látkami dodržujte následující pravidla:

- všechny radioaktivní látky musí být skladovány v původním balení a jen na místech k tomu určených,
- příjem a spotřeba radioaktivních látek musí být evidována,
- práce s radioaktivními látkami musí být prováděny pouze ve vyhrazených prostorách,
- pipetování nesmí být prováděno ústy,
- v laboratořích určených k práci s radioaktivními látkami je zakázáno jíst, pít, kouřit, líčit se a pod.,
- zabraňte přímému styku radioaktivních látek s pokožkou a používejte ochranné oděvy a rukavice. Po skončení práce s těmito látkami si vždy umyjte ruce,
- obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek,
- povrch pracovních stolů, který by mohl být kontaminován, je třeba pravidelně kontrolovat,
- v případě kontaminace nebo úniku radioaktivního materiálu postupujte podle stanovených předpisů
- všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami musí být řádně dekontaminováno a proměřeno před dalším použitím.

**4.3 Azid sodný**

Některé substance jsou konzervovány azidem sodným. Azid sodný může reagovat s olovem, mědí nebo mosazí za vzniku příslušných výbušných azidů. Proto likvidované reagenty splachujte velkým množstvím vody.

**4.4 Lidské sérum**

Materiál lidského původu obsažený v reagentech této soupravy měl negativní test na přítomnost protilátek proti viru HIV 1 a 2, viru hepatitidy C a proti povrchovému antigenu hepatitidy B (HBsAg). Žádná z dostupných metod nemůže dát stoprocentní jistotu neinfekčnosti. Je tedy nutné pracovat s těmito reagenty jako s potenciálně infekčními.

Se všemi vzorky séra a plazmy musí být manipulováno, jako s potenciálně infekčními (hepatitidy, nebo AIDS). Veškerý vzniklý odpad je třeba likvidovat podle platných předpisů.

**5. SBĚR A PŘÍPRAVA, SKLADOVÁNÍ A ŘEDĚNÍ VZORKŮ**

- Odebírejte, pokud možno na lačno, vzorky krve do zkumavek bez aditiv nebo s EDTA nebo heparinem.
- Odsředěním oddělte sérum nebo plazmu.
- Vzorky séra a plazmy lze skladovat při 2-8 °C, jestliže bude stanovení provedeno do 48 hodin. Při delším skladování je nutno vzorky zamrazit při <-18 °C nejlépe v alikvotech, aby se předešlo opakovanému rozmrazování a zmrazování.

**6. POSTUP STANOVENÍ**

**6.1 Příprava kontrolního vzorku**

Po vytemperování na laboratorní teplotu se obsah lahviček rozpustí v destilované vodě, jejíž objem je uveden na štítku lahvičky. Po přidání vody nechejte kontrolní vzorky volně rozpouštět 10 minut a potom lehce bez napěnění promíchejte. Rozpuštěné kontrolní vzorky je možno skladovat při 2-8 °C jeden týden, a po rozdělení na alikvoty zmrazené při <-18 °C do data expirace soupravy.

**6.2 Schéma postupu (viz tabulka uvedená na další straně)**

## 7. VÝSLEDKY

Výsledky jsou získány proložení z kalibrační křivky. Křivka slouží k určení koncentrace FT4 pouze ve vzorcích měřených současně s kalibrátory.

### 7.1 Kalibrační křivka

Výsledky uvedené v návodu byly získány v semit-log zobrazení (s použitím metody „splíne“). Na vertikální osu bylo vyneseno B/T (%) nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální osu byly vyneseny koncentrace FT4 v kalibrátorech (pmol/L). Jiné metody zpracování mohou dávat mírně odlišné výsledky.

Total cpm: 100 549 cpm				
Kalibrátor	FT4 (pmol/L)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	65 929	65,7	100
1	2,6	51 766	51,5	78,5
2	12,1	26 994	26,8	40,9
3	29,4	7 522	7,51	11,4
4	83,0	1 415	1,41	2,15

(Příklad typického stanovení, nepoužívejte pro výpočet.)

### 7.2 Vzorky

Na vertikální ose lokalizujte pro každý vzorek hodnoty B/T nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální ose odečtěte odpovídající koncentrace FT4 v pM. Přepočet koncentrací z pmol/L (nM) na ng/dL se provede vynásobením výsledků faktorem 0,0777.

## 8. KONTROLA KVALITY

Správná laboratorní praxe předpokládá, že se kontrolní vzorek používá v každé kalibraci, aby se zajistila kontrola kvality získaných výsledků. Kontrolní vzorky musí být zpracovány stejným způsobem jako neznámé vzorky a k vyhodnocení výsledků se mají použít vhodné statistické metody.

V případě závažného poškození obalu, nebo jestliže získané výsledky nejsou ve shodě s analytickými parametry stanovení (viz kap. 10), kontaktujte prosím naše odborné pracovníky.

Tel.: +420 272 017 391; fax: +420 272 017 385; E-mail: [imunochem@beckmancoulter.com](mailto:imunochem@beckmancoulter.com)

## 9. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní rozmezí referenčních hodnot. Uvedené hodnoty odpovídají klinickému předpokladu.

11,5 - 23,0 pM

Poznámka: hodnoty byly získány použitím léto soupravy pro stanovení 198 vzorků od eutyroidních jedinců.

## 10. ANALYTICKÉ PARAMETRY STANOVENÍ

(podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX")

### 10.1 Citlivost

10.1.1 Analytická citlivost: 0,5 pmol/L

10.1.2 Funkční citlivost: 2,4 pmol/L.

### 10.2 Specifita

Protílátka použitá v systému je vysoce specifická pro tyroxin. Ostatní přirozeně se vyskytující hormony (D-T4, T3, rT3 aj.), právě tak jako léčiva, která mohou být přítomna v patientských vzorcích (Amiodaron aj.) dávají extrémně nízkou zkříženou reakci.

### 10.3 Přesnost

#### 10.3.1 Intra-assay

Přesnost intra-assay byla stanovena 20krát opakovanou analýzou. Hodnota variačního koeficientu byla menší nebo rovna 8,3%, pro vzorky séra.

#### 10.3.2 Inter-assay

Vzorky byly analyzovány duplikátech v 15 nezávislých analýzách. Hodnota variačního koeficientu byla menší nebo rovna 7,5%, pro vzorky séra.

10.4 Rozsah stanovení (od analytické citlivosti do nejvyššího kalibrátoru): 0,5 – 75 pM.

## 11. OMEZENÍ POUŽITÍ SOUPRAVY

Nedodržení instrukcí uvedených v tomto návodu může vést k nesprávným výsledkům. Výsledky stanovení by měly být interpretovány ve světle celkového klinického obrazu pacienta včetně anamnézy, údajů z dalších testů a jiných vhodných informací.

Biotin přítomný v plazmě neinterferuje až do hodnot 40 ng/mL. V případě, že pacient je léčen vysokými dávkami biotinu (>5 mg/den), musí být krev odebírána nejdříve 3 hodiny po poslední dávce biotinu.

Souprava nebyla ověřována na neonatálních vzorcích.

Zvláštní pozornost věnujte interpretaci výsledků získaných analýzou hemolyzovaných nebo ikterických sér, protože metoda nebyla testována pro tento typ vzorků.

U stanovení využívajících protílátka existuje možnost interference heterofilních protílátek přítomných v patientském vzorku. Pacienti, kteří byli pravidelně ve styku se zvířaty nebo podstoupili imunoterapii nebo diagnostické procedury využívající imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinů, mohou produkovat protílátka jako například HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies - lidské protílátka proti myším proteinům), které interferují při imunologických stanoveních.

Takové interferující protílátka mohou vést k chybným výsledkům. Výsledky pacientů, u nichž existuje podezření na přítomnost lakových protílátek, posuďte s opatrností.

## 6.2 SCHÉMA POSTUPU STANOVENÍ

Krok 1 Pipetace*	Krok 2 Inkubace	Krok 3 Měření
Do potažených zkumavek postupně přidejte: -25 µL kalibrátoru, kontrolního nebo neznámého vzorku, -400 µL radioindikátoru a -100 µL ligandu. Promíchejte.	Inkubujte 60 Min. při 18-25 °C, za stálého třepání (>350 kmitů/min.).	Opatrně odsajte obsah každé zkumavky (s výjimkou 2 zkumavek pro „total“).  Měřte po dobu 1 min. vázanou aktivitu (B) a celkovou aktivitu (T).

\* Napipetujte po 400 µL radioindikátoru do 2 nepotažených zkumavek pro zjištění celkové aktivity (T).



**IN VITRO RADIOIMUNOANALYTICKÉ STANOVENÍ VOLNÉHO TRIJODTYRONINU  
V LIDSKÉM SÉRU A PLAZMĚ**



certified

**1. PRINCIP METODY**

Metoda stanovení volného T3 je založena na použití pro trijodtyronin specifické monoklonální protilátky, značené <sup>125</sup>I. Vzorek je společně s touto protilátkou inkubován ve zkumavce položená analogem T3 (ligand). Dochází ke kompetici mezi volným trijodtyroninem ve vzorku a ligandem. Po inkubaci se obsah zkumavek odešle a navázaná aktivita se změní gama-čítačem. Sestrojí se kalibrační křivka a z ní se odečtou koncentrace volného T3 v neznámých vzorcích.

**2. REAGENCIE**

Všechny reagenty v soupravě jsou stabilní do data expirace, uvedeného na štítku krabice, jestliže jsou skladovány při 2-8 °C.

**2.1 Souprava pro stanovení volného trijodtyroninu, 100 zkumavek (Kat. č.1579)**

- 2.1.1 Ligandem potažené zkumavky: 2x 50 kusů (připraveny k použití)
- 2.1.2 Monoklonální protilátka značená <sup>125</sup>I: 1 lahvička 45 mL; připravena k použití. Lahvička obsahuje ke dni výroby méně než 225 kBq <sup>125</sup>I značeného imunoglobulinu v roztoku s hovězím sérovým albuminem, azidem sodným (<0,1%, viz kap. Upozornění) a barvivem.
- 2.1.3 Kalibrátory: 5 lahviček po 1 mL; připraveny k použití. Lahvičky obsahují volný T3 o koncentracích od 0 do 44 pM v lidském séru (viz kap. Upozornění). Přesné koncentrace jsou uvedeny na štítcích lahviček. Hodnoty kalibrátorů byly nastaveny pomocí vnitřního referenčního materiálu.
- 2.1.4 Kontrolní vzorek: 1 lahvička po 1 mL; připraven k použití. Vzorek obsahuje volný T3 v lidském séru (viz kap. Upozornění). Očekávané hodnoty jsou uvedeny na štítcích lahviček.

**2.2 Souprava pro stanovení volného trijodtyroninu, 400 zkumavek (Kat. č.3320)**

- 2.2.1 Ligandem potažené zkumavky: 8 x 50 kusů (připraveny k použití)
- 2.2.2 Monoklonální protilátka značená <sup>125</sup>I: 4 lahvičky po 45 mL; připraveno k použití.
- 2.2.3 Kalibrátory: 5 lahviček po 1 mL; připraveny k použití
- 2.2.4 Kontrolní vzorek: 1 lahvička po 1 mL; připraven k použití.  
*Upozornění: Teplota a data expirace uvedené na lahvičkách se týkají pouze dlouhodobého skladování komponent u výrobce, před jejich vložením do soupravy. Nebraťte na ně tedy, prosím, ohled.*

**3. ZAŘÍZENÍ A POTŘEBNÝ MATERIÁL**

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

- přesná mikropipeta (100 µL)
- poloautomatická pipeta (400 µL)
- vibrační mišadlo
- horizontální lžepačka
- vývěva
- gama-čítač kalibrovaný na <sup>125</sup>I

**4. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ**

- 4.1 Obecné poznámky:
  - Nechejte reagenty před pipetací vyteperovat na lab. teplotu,
  - Nemíchejte substance ze souprav různých šarží,
  - Ke každé řadě stanovení je třeba vždy stanovit novou kalibrační závislost,
  - Přesné nastavení lžepačky je důležité reprodukovatelnost stanovení,
  - Doporučuje se provádět stanovení v duplikátech.
  - Veškerý odpad je třeba likvidovat v souladu s příslušným zákonem.
  - Zkumavky jsou pouze na jedno použití.
- 4.2 Základní pravidla radiační bezpečnosti
  - Tato souprava obsahuje méně než 225 kBq <sup>125</sup>I ke dni výroby. Tento radioaktivní materiál mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracoviště, která splňují platné zákonné předpisy upravující podmínky pro bezpečné nakládání s otevřenými radionuklidovými zářiči.
  - Při práci s radioaktivními látkami dodržujte následující pravidla:
    - všechny radioaktivní látky musí být skladovány v původním balení a jen na místech k tomu určených,
    - přijem a spotřeba radioaktivních látek musí být evidována,

- práce s radioaktivními látkami musí být prováděny pouze ve vyhrazených prostorech,
- pipetování nesmí být prováděno ústy,
- v laboratořích určených k práci s radioaktivními látkami je zakázáno jíst, pít, kouřit, líčit se a pod.,
- zabraňte přímému styku radioaktivních látek s pokožkou a používejte ochranných oděvů a rukavic,
- po skončení práce s těmito látkami si vždy umyjte ruce,
- obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek,
- povrch pracovních stůlů, který by mohl být kontaminován, je třeba pravidelně kontrolovat,
- v případě kontaminace nebo úniku radioaktivního materiálu postupujte podle stanovených předpisů
- všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami musí být řádně dekontaminováno a proměřeno před dalším použitím.

**4.3 Azid sodný**

Některé substance jsou konzervovány azidem sodným. Azid sodný může reagovat s olovem, mědí nebo mosazí za vzniku příslušných výbušných azidů. Proto likvidované reagenty splachujte velkým množstvím vody.

**4.4 Lidské sérum**

Materiál lidského původu obsažený v reagentech této soupravy měl negativní test na přítomnost protilátek proti viru HIV 1 a 2, viru hepatitidy C a proti povrchovému antigenu hepatitidy B (HBsAg). Žádná z dostupných metod nemůže dát stoprocentní jistotu neinfekčnosti. Je tedy nutné pracovat s těmito reagenty jako s potenciálně infekčními. Se všemi vzorky séra a plazmy musí být manipulováno, jako s potenciálně infekčními (hepatitida, nebo AIDS). Veškerý vzniklý odpad je třeba likvidovat podle platných předpisů.

**5. SBĚR A PŘÍPRAVA, SKLADOVÁNÍ A ŘEDĚNÍ VZORKŮ**

- Odebírejte vzorky krve, pokud možno nalačno, do zkumavek bez aditiv nebo s EDTA.
- Odstředěním oddělte sérum nebo plazmu.
- Vzorky séra a plazmy lze uchovávat při 2-8 °C, jestliže bude stanovení provedeno do 48 hodin. Při delším uchování je nutno vzorky zamrazit při (<-18 C), nejlépe v alikvotech, aby se předešlo opakovanému rozmrazování a zmrazování.

**6. POSTUP STANOVENÍ (viz tabulka na další straně)**

**7. VÝSLEDKY**

Výsledky jsou získány proložením z kalibrační křivky. Křivka slouží ke stanovení koncentrace volného T3 pouze ve vzorcích měřených současně se kalibrátory.

**7.1 Kalibrační křivka**

Výsledky uvedené v návodu byly vypočteny proložením křivky v semi-logaritmických souřadnicích metodou „splíne“. Na vertikální osu bylo vyneseno B/T (%) nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální osu byly vyneseny koncentrace volného T3 ve kalibrátorech (pM). Jiné metody zpracování mohou dávat mírně rozdílné výsledky.

Celková aktivita: 85959 cpm				
Kalibrátory	Volný T3 (pg/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	82116	95,5	100
1	2,1	68939	80,2	84,0
2	5,1	52225	60,8	63,6
3	10,4	34354	40,0	41,8
4	44	8890	10,3	10,8

(Příklad typického stanovení, nepoužívejte pro výpočet.)

**7.2 Vzorky**

Na vertikální ose lokalizujte pro každý vzorek hodnoty B/T nebo B/B<sub>0</sub> (%) a na horizontální ose odečtete odpovídající koncentrace volného T3 v pM. Přepočít koncentrací z pmo/L (pM) na pg/mL se provede vynásobením výsledků faktorem 0,651.

## 8. KONTROLA KVALITY

Správná laboratorní praxe předpokládá, že se kontrolní vzorek používá v každé kalibraci, aby se zajistila kontrola kvality získaných výsledků. Kontrolní vzorky musí být zpracovány stejným způsobem jako neznámé vzorky a k vyhodnocení výsledků se mají použít vhodné statistické metody.

V případě závažného poškození obalu, nebo jestliže získané výsledky nejsou ve shodě s analytickými parametry stanovení (viz kap. 10), kontaktujte prosím naše odborné pracovníky. Tel.: +420 272 017 391; fax: +420 272 017 385; e-mail: [imunochem@beckmancoulter.com](mailto:imunochem@beckmancoulter.com)

## 9. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní rozmezí referenčních hodnot. Následující hodnoty byly stanoveny u zdravých jedinců a jsou zde uvedeny pro informaci.

2,5 – 5,8 pM

Poznámka: uvedené hodnoty byly stanoveny v několika studiích v 531 sérech od eutyroidních jedinců.

## 10. ANALYTICKÉ PARAMETRY STANOVENÍ

(podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX")

### 10.1 Citlivost

10.1.1 Analytická citlivost: 0,5 pM

10.1.2 Funkční citlivost: 1,0 pM

### 10.2 Specifita

Protilátka použitá v systému je vysoce specifická pro T3. Extrémně nízké zkřížené reakce byly naměřeny s příbuznými molekulami (L-T4, D-T4, rT3, ald.).

### 10.3 Přesnost

#### 10.3.1 Intra-assay

Přesnost intra-assay byla stanovena 15-krát opakovanou analýzou. Hodnota variačních koeficientů byla menší nebo rovna 6,4 % pro vzorky séra.

#### 10.3.2 Inter assay

Vzorky byly analyzovány duplikátech v 10 nezávislých analýzách. Hodnota variačních koeficientů byla menší nebo rovna 5,5 % pro vzorky séra.

### 10.4 Rozsah stanovení (od analytické citlivosti do nejvyššího kalibrátoru):

0,5 – 44 pM.

## 11. OMEZENÍ POUŽITÍ SOUPRAVY

Nedodržení instrukcí uvedených v tomto návodu může vést k nesprávným výsledkům. Výsledky stanovení by měly být interpretovány ve světle celkového klinického obrazu pacienta včetně anamnézy, údajů z dalších testů a jiných vhodných informací.

U stanovení využívajících protilátky existuje možnost interference heterofilních protilátek přítomných v patientském vzorku. Pacienti, kteří byli pravidelně ve slyku se zvířaty nebo podstoupili imunoterapii nebo diagnostické procedury využívající imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinů, mohou produkovat protilátky jako například HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies - lidské protilátky proti myším proteinům), které interferují při imunologických stanoveních.

Takové interferující protilátky mohou vést k chybným výsledkům. Výsledky pacientů, u nichž existuje podezření na přítomnost takovýchto protilátek, posuzujte s opatrností.

## 6. SCHEMA POSTUPU STANOVENÍ

Krok 1 Pipetace	Krok 2 Inkubace	Krok 3 Měření
Do potažených zkumavek postupně přidejte:  -100 $\mu$ L kalibrátoru nebo vzorku a -400 $\mu$ L radioindikátoru.  Promíchejte.	Inkubujte 120 minut při 18-25 $^{\circ}$ C za stálého třepání (350 kmitů/min).	Opatrně odsajte obsah každé zkumavky (s výjimkou 2 zkumavek T).  Měřte vázanou aktivitu (B) a celkovou aktivitu (T) po dobu 1 minuty.

\* Napipetujte po 400  $\mu$ L radioindikátoru do 2 nepotažených zkumavek pro zjištění celkové aktivity (T).