

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИЙОДИРОНИНА (ТЗ)

3144-16, ТЗ ELISA

Каталог. № : 3144-16
Производитель: DAI (США)

Методика от 16-09-2015



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала инструкции и перевода должны совпадать.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Анализ	ТЗ ELISA
Метод	Иммунорентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конкурентный ИФА
Диапазон обнаружения	0-10 нг/мл
Образец	50 мкл Сыворотки
Специфичность	96.30 %
Чувствительность	0.2 нг/мл
Общее время	~ 80 мин.
Срок годности	12 месяцев

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для количественного определения трийодтиронина (ТЗ) в человеческой сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ

Тироидная железа является главным компонентом эндокринной системы. Тироидные гормоны исполняют множество функций. Они влияют на силу и существенное регуляторное влияние на рост, дифференциацию, клеточной метаболизм и основной гормональный баланс, так же как и на обслуживание метаболической активности и развития скелета и системы органов. Гормоны тироксин Т4 и 3,5,3' трийодтиронин (ТЗ) циркулируют в кровяном потоке, в основном связываются с протеинами плазмы, тироксин связанном глобулином (ТВГ). Концентрация ТЗ меньше чем Т4, но его метаболическая потенциальность значительно выше.

Определения ТЗ – важный фактор при диагнозе тироидных болезней. Его измерение имеет раскрытый вариант гипертироидизма в тироидных пациентов с высоким уровнем ТЗ и нормальным уровнем Т4. Увеличение ТЗ без увеличения Т4 часто предшествует возврату тироитоксикоза в предварительно исследованных пациентов. В других пациентов, эутиреоз показывает нормальный ТЗ и субнормальный Т4.

Определение ТЗ также используется при мониторинге пациентов, исследуемых на гипертироидизм и пациентов, которые имели прекращающуюся анти-тироидную лекарственную терапию. Это также используется для различения эутиреоза и гипертироидных пациентов.

В женщин, уровень ТЗ увеличивается во время беременности, при принятии эстрогенов и гормональной терапии, параллельно ТВГ увеличивается подобно уровням Т4. Также уменьшение ТВГ концентрации уменьшает концентрацию ТЗ. Эти изменения уровня ТЗ не являются реальными показателями тироидного статуса.

ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ

В наборе ТЗ лунки планшетки покрыты точным количеством антител. Вымеренное количество сыворотки пациента и постоянное количество ТЗ конъюгировано с пероксидазой хрена добавляются в лунки. Во время инкубации конъюгированный ТЗ и ТЗ образцов конкурируют за связывание с иммобилизованными антителами. Через 60 минут инкубации при комнатной температуре лунки промывают водой 5 раз для удаления несвязавшегося конъюгата ТЗ. В лунки добавляют раствор ТМБ (тетраметилбензидина) и инкубируют 20 минут, в течении которых в лунках развивается голубая окраска. Реакцию останавливают стоп-раствором и измеряют оптическую плотность лунок при 450 нм. Интенсивность окраски пропорциональна количеству присутствующего энзима и обратно-пропорциональна количеству ТЗ в пробе. По калибровочной кривой зависимости интенсивности окраски от содержания ТЗ в калибровочных пробах вычисляют содержание ТЗ в анализируемых образцах.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сыворотку получают из проб цельной крови, взятых подходящим способом. Набор предназначен для работы с образцами сыворотки без примесей.

МАТЕРИАЛЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

1. Планшет с лунками, покрытыми антителами ТЗ, 96 лунок.
2. Концентрат конъюгата ТЗ HRPO, 0,8 мл
3. Разбавитель конъюгата ТЗ HRPO, 15 мл.
4. Референтный стандарт, 1 набор, готов к использованию.
5. ТМВ субстрат, 12 мл
6. Стоп-раствор, 12 мл.
7. Концентрат промывочного буфера (50x), 15 мл.

Материалы, не входящие в комплект поставки

1. Дистиллированная вода.
2. Точные пипетки: 0,05 - 0,2 мл, 1.0 мл
3. Наконечники для пипеток.
4. Микропланшетный ридер
5. Вихревой смеситель или аналог.
6. Промокательная бумага.
7. Бумага для построения графиков.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1. Перед использованием приведите реагенты к комнатной температуре (18-25 °C).
2. Разбавьте 1 часть промывочного буфера (50x) 49 частями дистиллированной воды. Например, разбавьте 15 мл промывочного буфера (50x) дистиллированной водой, чтобы приготовить 750 мл промывочного буфера (1x). Перед использованием хорошо перемешать.
3. Для приготовления реагента конъюгата ТЗ HRPO, добавьте 0.1 мл концентрата конъюгата ТЗ HRPO к 2.0 мл разбавителя конъюгата ТЗ HRPO (1:20 разбавление) и тщательно перемешайте. Количество разбавленного конъюгата зависит от объема анализа. Реагент конъюгата стабилен при 4 °C по крайней мере две недели.

Примечание: анализ ТЗ является чувствительным к температуре. Наилучшими температурными условиями для этого теста являются 19-22 °C. Если температура окружающей среды выше, рекомендуется увеличить разбавление конъюгата ТЗ до 1:40.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Установите нужное количество лунок с антителами в рамке для стрипов. Сделайте лист данных для идентификации образцов.
2. Внесите 50 мкл стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Тщательно перемешайте в течении 10 секунд, затем внесите 100 мкл реагента ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешивайте содержимое лунок в течении 30 секунд. Важно добиться полного перемешивания.
5. Инкубируйте при комнатной температуре в течении 60 мин.
6. Удалите инкубационную смесь из планшета.
7. Промыть лунки промывочным буфером (1x) 5 раз.
8. Перевернуть планшет на расстеленный лист промокательной бумаги для удаления остатков жидкости.
9. Внесите 100 мкл раствора ТМБ в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течении 5 секунд.
10. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течении 20 минут без встряхивания.
11. Остановите реакцию внесением 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
12. Аккуратно перемешивайте на протяжении 15 секунд.
13. Очень важно, чтоб синий цвет полностью изменился на желтый.
14. Измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм в течении 15 минут.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

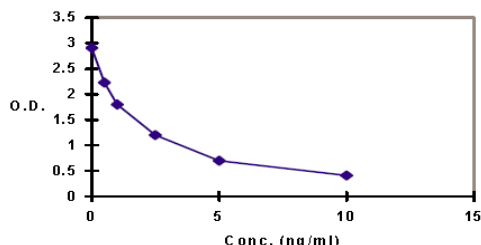
1. Рассчитать средние значения поглощения (A_{450}) для каждого стандарта, контрольных сывороток и образцов.
2. Рекомендуется использовать соответствующее оборудование для вычисления результатов. Если оборудование не доступно, на бумаге для графиков построить калибровочную кривую, откладывая на вертикальной оси (Y) значение поглощения для каждого стандарта против его концентрации в нг/мл на горизонтальной оси (X).
3. С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию ТЗ в нг/мл.

Пример построения калибровочной кривой

1. Результаты получают с помощью калибровочной кривой.

ТЗ (нг/мл)	ОП (450 нм)		
	I	II	Среднее
0,0	2,91	2,83	2,87
0,5	2,23	2,22	2,22
1,0	1,80	1,74	1,77
2,5	1,20	1,12	1,16
5,0	0,70	0,66	0,68
10,0	0,41	0,32	0,37

2. Калибровочная кривая: Пример построения калибровочной кривой приведен в качестве иллюстрации и не должен использоваться для вычисления неизвестных значений. Каждая лаборатория должна обеспечить свои собственные данные и калибровочную кривую.



Ожидаемые значения и чувствительность

Нормальный диапазон: 0,8-2,0 нг/мл

Минимальная концентрация ТЗ, определяемая с помощью этого набора, составляет 0,2 нг/мл.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- I. Достоверность:** сравнение между нашим тестом и коммерчески доступным тестом предоставило следующие данные:

N = 128
 Коэффициент корреляции = 0.977
 Наклон = 0.833
 Пересечение = 0.012
 Среднее (наши наборы) = 0.58
 Среднее (Abbott) = 0.62

II. Точность:

1) Внутрисерийная:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	0.79	0.086	10.88
Уровень 2	20	2.54	0.11	4.26
Уровень 3	20	6.45	0.27	4.10

2) Между сериями:

Концентрации	N	Среднее	SD	CV, %
Уровень 1	20	0.68	0.079	11.61
Уровень 2	20	2.11	0.13	5.97
Уровень 3	20	5.73	0.34	6.01

III. Линейность:

Две сыворотки пациента с серийно развели Стандарт 0 Ед/мл в линейном исследовании. Среднее восстановление составило 100.5 %.

Образец А			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	8.41	8.41	
2X	4.21	3.93	93.5
4X	2.11	2.09	99.3
8X	1.06	1.07	100.9
16X	0.53	0.54	101.9
Среднее восстановление: 98.9 %			

Образец В			
Разведение	Ожидаемое значение	Полученное значение	Восстановление, %
Неразбавленный	8.47	8.47	
2X	4.24	4.04	95.4
4X	2.12	2.23	105.2
8X	1.06	1.14	107.5
16X	0.53	0.53	100.0
Среднее восстановление: 102.0 %			

IV. Восстановление

Среднее восстановление составило 95.4 %.
 (Табл. См. оригинал инструкции).

V. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация этого анализа составляет 0.2 нг/мл.

VI. Перекрестная реактивность

Следующие антигены маркеров рака в высоких концентрациях были проанализированы, чтобы определить возможные реактивности.

Antigens	Concentration	Equivalent T3	% Cross-Reactivity
Triiodothyroacetic Acid	100 ng/ml	8.0 ng/ml	8.00
Monoiodothyrosine	50,000 ng/ml	0.45 ng/ml	0.0009
Diiodotyrosine	50,000 ng/ml	0.36 ng/ml	0.0007
Methimazole	500,000 ng/ml	0.31 ng/ml	0.00006
5,5'-Diphenylhydantoin	10,000 ng/ml	0.32 ng/ml	0.0032
Phenylbutazone	1,000,000 ng/ml	0.68 ng/ml	0.00007
6-n-propyl-2-thiouracil	100,000 ng/ml	0.65 ng/ml	0.0007
Salicylic Acid	1,000,000 ng/ml	0.39 ng/ml	0.00004
Acetylsalicylic Acid	500,000 ng/ml	0.38 ng/ml	0.00008

ХРАНЕНИЕ НАБОРА

1. Набор следует хранить при 2-8 °С до окончания срока пригодности.
2. Планшет следует хранить в закрытой упаковке с влагопоглотителем до конца срока годности.

ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Для измерения абсорбции следует использовать микропланшетный ридер с шириной полосы 10 нм или меньше и оптической плотностью 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕВ»
 ул. Чорновола, 97
 г. Ивано-Франковск, 76005
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com