



Набор для определения СВОБОДНОГО ТРИЙОДИРОНИНА

Free T3 EIA KIT

Кат. № : 101-2385
Количество тестов : 96
Производитель : DRG (USA)

Методика от 04/04/2008

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации свободного трийодтиронина в человеческой сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ

Трийодтиронин (Т3), тироидный гормон, циркулирует в крови, в основном со связанным протеином-носителем (>99.5%). Основным носителем протеином является тироксин-связанный глобулин (ТВГ). Однако свободная (несвязанная) часть Т3 ответственная за биологическую активность. Более того, концентрация протеина-носителя растет при разных клинических условиях, например, при беременности. В индивидов с нормальной тироидной функцией общий уровень Т3 изменяется, тогда как концентрация свободного Т3 остается неизменной. Поэтому измерение концентрации свободного Т3 больше связано с клиническим статусом, чем уровень общего Т3.

Например, рост общего Т3 связанный с беременностью, приемом контрацептивов и эстрогенной терапией, иногда результат уровня общего Т3 находится за нормальными границами, тогда как концентрация свободного Т3 остается неизменной. Данный микропланшетный иммуноферментный набор поставляется с оптимальной чувствительностью, как того требует техническая манипуляция для прямого определения свободного Т3.

ПРИНЦИП

FT3 является твердофазовым иммуноферментным анализом. Стандарт сыворотки, образец пациента и Т3 энзимного конъюгата рабочий реагент добавляется в ячейку микропланшета, покрытого моноклональным Т3 антителом. Происходит реакция конкурентного связывания между энзимным конъюгатом и образцом свободного Т3 за ограниченное число связанных антител, иммобилизованных на сторонах ячеек. После 60 минутной инкубации при комнатной температуре, ячейки промываются водой для удаления несвязанного Т3 конъюгата. Потом добавляется раствор H_2O_2 /ТМВ потом добавляется и инкубируется 20 минут, в результате чего происходит развитие

голубого окраса. Развитие окраса останавливается добавлением стоп раствора и абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Интенсивность окраса пропорционально количеству присутствующего энзима и обратно пропорционально количеству немеченого FT3 в образце. Концентрация FT3 в неизвестных образцах количественно определяется согласно серии стандартов FT3.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Материалы, входящие в состав набора:

- Планшет с лунками, покрытыми антителами, 96 лунок.
- Т3 энзимный конъюгат концентрат, 10,5 мл, готовый к использованию
- FT3 стандарты, 0, 0,9, 2,2, 5,0, 9,0 и 19,0 пг/мл, 1 набор, 1,0 мл каждого, готовый к использованию. Для SI единиц: $1 \text{ пг/мл} \times 1,536 = \text{п/моль/л}$.
- Цветной реагент А, 13 мл.
- Цветной реагент В, 13 мл.
- Стоп-Раствор (3N HCl), 10 мл.

Материалы, не входящие в состав поставки:

- Пипетки для внесения 50 мкл с точностью выше, чем 1,5 %.
- Диспенсер для повторного внесения 0,050 мл и 0,200 мл с точностью выше, чем 1,5%.
- Микропланшетный ридер при 450 нм
- Тестовые пробирки для разбавления энзимного конъюгата и для смешивания цветного реагента А и цветного реагента В
- Абсорбирующая бумага
- Таймер
- Материалы контроля качества.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сыворотку получают из проб цельной крови, взятых подходящим способом. Набор предназначен для работы с образцами сыворотки без примесей. Образцы сыворотки могут храниться в холоде при 2-8°C максимум 48 часов. Если образцы не будут проанализированы в течении 48 часов, они могут храниться при -20°C до 30 дней.

ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Невскрытый набор следует хранить при 2-8°C до окончания срока пригодности. Планшет следует хранить в закрытой упаковке с влагопоглотителем до конца срока годности. Вскрытый набор стабилен для окончания срока пригодности., если хранить как указано выше. Для измерения абсорбции следует использовать микропланшетный ридер с шириной полосы 10 нм или меньше и оптической плотностью 0-2ОП или выше при длине волны 450 нм.

ПОДГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Рабочий раствор субстрата – приготовьте немедленно перед использованием.

Для приготовления H_2O_2 /ТМВ раствора, приготовьте 1:1 смешивание цветного реагента А и цветного реагента В за 1 час перед использованием. Тщательно перемешайте. Приготовленный раствор H_2O_2 /ТМВ реагент должен быть сделанным за 15 минут перед

использованием и является стабильным при комнатной температуре в темноте до 3 часов. Уничтожьте остаток после использования.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед процедурой приведите все реагенты, стандарты и контроли к комнатной температуре (18-25°C)

1. Приготовьте микропланшет для анализа стандартов, контроля и сывороток пациента в дубле.
2. Внесите 50 мкл стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите 100 мкл Реагента ферментного Конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешайте содержимое лунок в течении 20-30 секунд и накройте.
5. Инкубируйте при комнатной температуре в течении 60 мин.
6. Удалите содержимое лунок. Промойте и опустошите лунки дистиллированной водой 5 раз. Перевернуть планшет на растеленный лист фильтровальной бумаги или бумажное полотенце для удаления остатков жидкости.
7. Внесите 200 мкл рабочего раствора субстрата в каждую лунку. **Всегда добавляйте реагенты в том самом порядке, чтоб минимизировать разницу между реакционным временем ячеек.** Аккуратно перемешайте в течении 10 секунд.
8. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течении 20 минут.
9. Остановите реакцию внесением 50 мкл Стоп Раствора в каждую лунку.
10. Аккуратно перемешайте на протяжении 30 секунд. **Очень важно, что б голубой цвет полностью изменился на желтый.**
11. Измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм в течении 30 минут.

РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитать средние значения поглощения (A_{450}) для каждого стандарта, контрольных сывороток и образцов.
2. Постройте калибровочную кривую, откладывая на вертикальной оси (Y) значение поглощения для каждого стандарта против его концентрации в пг/мл на горизонтальной оси (X).
3. С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию свободного Т3 в пг/мл. со стандартной кривой.

ПРИМЕР ПОСТРОЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты получают с помощью калибровочной кривой. Пример построения калибровочной кривой приведен в качестве иллюстрации.

FT3 (пг/мл)	ОП (450 нм) Среднее
0	2,478
0,9	1,862
2,2	1,483
5,0	0,927
9,0	0,576
19,0	0,338

См. график в англ. инструкции.

ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Достоверность

Данный набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотиреоидной, эутиреоидной и гипертиреоидной популяции (значения в границах 0,1-14 пг/мл). Общее число образцов 85. Список уравнения квадратной регрессии и коэффициент корреляции были компьютеризированы и сравнены с установленным методом.

Метод	Среднее (x)	Анализ квадратной регрессии	Коэффициент корреляции
Данный метод	3,4	$Y=0.15+0.925(x)$	0,955
Установленный	3,5		

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

2. Точность

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

Внутритестовая точность (в пг/мл)

Образец	N	X	CO	KB,
Низкий	20	1,37	0,16	11,9%
Нормальный	20	4,21	0,17	4,1%
Высокий	20	7,1	0,17	2,4%

Между тестовая точность (величины в пг/мл)*

Образец	N	X	CO	KB,
Низкий	10	1,4	0,15	10,7%
Нормальный	10	4,4	0,23	5,2%
Высокий	10	7,0	0,3	4,2%

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

3. Специфичность

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

Вещество	Перекрестная реактивность	Концентрация
I-трийодтиронин	1,0000	---
I-тироксин	< 0,0002	10 мкг/дл
Фенилбутазон	< 0,0001	10 мкг/дл
Салицилат натрия	< 0,0001	10 мкг/дл
Йодотирозин	< 0,0001	10 мкг/мл
Дийодотирозин	< 0,0001	10 мкг/мл
Дийодотиронин	< 0,0001	10 мкг/мл

Чувствительность

Чувствительность набора составляет 0,05 пг/мл. Чувствительность была получена исходя из вариабельности сыворотки и используя 0 пг/мл калибратора и используя 2СО (95%) для вычисления минимальной дозы.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

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

	Взрослые (110 образцов)	Беременные (30 образцов)
Среднее	2,8	3,0
Стандартное отклонение	0,7	0,6
Ожидаемые границы (+2 СО)	1,4-4,2	1,8-4,2

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.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Увеличение концентрации в сыворотке связующего протеина будет показывать соответствующее изменение концентрации общего Т3, тогда как физиологическая активность FT3 остается неизменной в эутироидных индивидов. Поэтому, определение концентрации FT3 дает более точную оценку тироидного статуса, чем измерение общего Т3. Повышенный уровень FT3 указывает на гипертироидизм, а низкий уровень указывает на гипотироидизм.

ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

1. Достоверные результаты будут получены только при условии следования всем рекомендациям, поданным в инструкции.
2. Критический момент - промывание. Недостаточное промывание приведет к неточной и неправильной абсорбции.
3. Не используйте сильно липемические, сильно гемолизированные и мутные образцы.
4. Полученные результаты следует использовать как дополнение к другим диагностическим процедурам и доступной информации.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Черновола 97,
 г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: +38 (0342) 77 51 22
 Тел/факс: +38 (0342) 77 56 12
 E-mail: info@diameb.com