



Набор ИФА для определения СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА (FT4)

Кат. № : EIA-2386
К-во тестов : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 24-10-2011
Версия 16.0

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации свободного тироксина в человеческой сыворотке.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

FT4 является твердофазовым иммуноферментным анализом. Стандарт сыворотки, образец пациента и T4 ферментного конъюгата рабочий реагент добавляется в лунку микропланшета, покрытого моноклональным T4 антителом. Происходит реакция конкурирования между ферментным конъюгатом и образцом свободного T4 за ограниченное число связанных антител, иммобилизованных на сторонах лунок. После 60 минутной инкубации при комнатной температуре, ячейки промываются водой для удаления несвязанного T4 конъюгата. Потом добавляется раствор H₂O₂/TMB 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 фермента и обратно пропорционально количеству немеченого FT4 в образце. Концентрация FT4 в неизвестных образцах количественно определяется согласно серии стандартов FT4.

РЕАГЕНТЫ

Материалы, входящие в состав набора:

- Планшет с лунками, покрытыми антителами к T4, 96 лунок.
- Ферментный конъюгат FT4 концентрат, 1 фл./10,5 мл, готовый к использованию
- Набор референтных стандартов FT4, 1,0 мл/флакон. Шесть флаконов референтной сыворотки FT4 с приблизительными* концентрациями 0, 0,4, 1,1, 2,2, 4,1 и 8,0 нг/дл. Был добавлен консервант, жидкий, готовый к использованию.
* Точные концентрации указаны на этикетках каждой отдельной партии.
- Цветной реагент А, 1 бут., 13 мл.
- Цветной реагент В, 1 бут., 13 мл.
- Стоп-раствор (3N HCl), 1 бут., 10 мл.
Содержит разбавленную соляную кислоту.

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 ферментного конъюгата и для смешивания цветного реагента А и цветного реагента В.
- Абсорбирующая бумага для высушивания лунок микропланшета
- Таймер
- Контрольная сыворотка для контроля качества.

СБОР И ПОДГОТОВКА 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^oC максимум 48 часов. Если образцы не будут проанализированы в течении 48 часов, они могут храниться при -20^oC до 30 дней.

ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Не вскрытый набор следует хранить при 2-8^oC 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 ниже. Для измерения абсорбции следует использовать микропланшетный ридер с шириной полосы 10 нм или меньше и оптической плотностью 0-20П или выше при длине волны 450 нм.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Раствор рабочего субстрата – приготовьте непосредственно перед использованием.

Для приготовления H₂O₂/TMB раствора, приготовьте 1:1 смешивание цветного реагента А и цветного реагента В за 1 час перед использованием. Тщательно перемешайте. Приготовленный раствор H₂O₂/TMB 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^oC)

1. Расположите лунки микропланшета для каждой референтной сыворотки, контроля и образца пациента для анализа в дубли.
2. Внесите по 50 мкл соответствующей референтной сыворотки, контроля и образца в соответствующие лунки.
3. Внесите по 100 мкл реагента ферментного конъюгата FT4 во все лунки.
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. Добавьте по 200 мкл рабочего раствора субстрата в каждую лунку. **Всегда добавляйте реагенты в том самом порядке, чтобы минимизировать разницу между реакционным временем лунок.** 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, чтобы 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 (A₄₅₀) 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 нг/дл на горизонтальной оси (X).
3. С помощью средних значений поглощения для каждого образца по калибровочной кривой определить соответствующую концентрацию FT4 в нг/дл.

ПРИМЕР ПОСТРОЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

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

FT4 (нг/дл)	Абсорбция (450 нм)
0	2,797
0,45	2,465
1,2	1,582
2,2	0,934
4,5	0,487
7,2	0,320

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Достоверность

Данный набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотиреоидной, эутиреоидной и гипертиреоидной популяции (значения в границах 0,1-8 нг/дл). Общее число образцов 85. Список уравнения квадратной регрессии и коэффициент корреляции были компьютеризированы и сравнены с установленным методом.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

Метод	Среднее (x)	Анализ наименьшей квадратной регрессии	Коэффициент корреляции
Данный метод	1,60	$y = 0,9513(x) + 0,0582$	0,9597
Референтный	1,64		

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

Точность

Точность анализе и между ними была определена при исследовании трех разных уровней сыворотки. Полученные данные показаны в таблицах ниже:

Точность в анализе (в нг/дл)

Образец	К-во	Среднее	СО	КВ
Низкий	20	0,550	0,061	10,98%
Средний	20	1,740	0,074	4,26%
Высокий	20	3,250	0,106	3,25%

Точность между анализами (величины в нг/дл)

Образец	N	Среднее	СО	КВ
Низкий	10	0,480	0,052	10,81%
Средний	10	1,410	0,085	6,01%
Высокий	10	3,490	0,279	7,90%

Специфичность

(См. данные специфичности в оригинале инструкции).

Влияние эндогенно введенных лекарств и эстрогенов см. в оригинале инструкции.

Чувствительность

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

Ожидаемые значения (в нг/дл)

	Взрослые (110 образцов)	Беременные (30 образец)
Среднее (X)	1,40	1,50
Стандартное отклонение	0,60	0,37
Ожидаемые границы (± 2 СО)	0,8-2,0	0,76-2,24

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 Т4, тогда как физиологическая активность FT4 остается неизменной в эутироидных индивидов. Поэтому, определение концентрации FT4 дает более точную оценку тироидного статуса, чем измерение общего Т4. Повышенный уровень FT4 указывает на гипертироидизм, а низкий уровень указывает на гипотироидизм.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Достоверные результаты будут получены только при условии следования всем рекомендациям, поданным в инструкции.
2. Важнейший момент - промывка. Недостаточная промывка 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.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).