

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТРИЙОДИРОНИНА (fT3)

EIA-2385, fT3

Каталог. № : EIA-2385 Методика от 14-12-2009
Количество : 96 Версия 13.0
Производитель: DRG (Германия)



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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации свободного трийодтиронина в человеческой сыворотке.

2. ВВЕДЕНИЕ

Трийодтиронин (Т3), тиреоидный гормон, циркулирует в крови, в основном со связанным протеино-носителем (>99.5%). Основным носителем протеином является тироксин-связанный глобулин (TBG). Однако свободная (несвязанная) часть Т3 ответственна за биологическую активность. Более того, концентрация протеина-носителя растет при разных клинических условиях, например, при беременности. В индивидов с нормальной тиреоидной 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.

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

fT3 является твердофазовым иммуноферментным анализом. Стандарт сыворотки, образец пациента и Т3 ферментного конъюгата рабочий реагент добавляется в ячейку микропланшета, покрытого моноклональным Т3 антителом. Происходит реакция конкурентного связывания между ферментным конъюгатом и образцом свободного Т3 за ограниченное число связанных антител, иммобилизованных на сторонах лунок. После 60 минутной инкубации при комнатной температуре, ячейки промываются водой для удаления несвязанного Т3 конъюгата. Потом добавляется раствор H₂O₂/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 фермента и обратно пропорционально количеству немеченого fT3 в образце. Концентрация fT3 в неизвестных образцах количественно определяется согласно серии стандартов fT3.

4. РЕАГЕНТЫ

4.1 Материалы, входящие в состав набора:

- Планшет с лунками, покрытыми антителами, 96 лунок.
- Т3 ферментный конъюгат - концентрат, 10,5 мл, готовый к использованию
- Набор референтных fT3 стандартов, 0, 0,9, 2,2, 5,0, 9,0 и 19,0 пг/мл, 1 набор, 1,0 мл каждого, готовый к использованию. *Точные концентрации указаны на этикетках с пометкой серии реагента.
- Цветной реагент А, 13 мл. Содержит перекись водорода в ацетатном буфере.
- Цветной реагент В, 13 мл. Содержит ТМБ, стабилизированный в растворе буфера.
- Стоп-раствор (3N HCl), 10 мл.

4.2 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
- Таймер
- Материалы контроля качества.

5. 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 °C максимум 48 часов. Если образцы не будут проанализированы в течении 48 часов, они могут храниться при -20 °C до 30 дней.

6. ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Невыскранный 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 0-2 ОП или выше при длине волны 450 нм.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Раствор рабочего субстрата – приготовьте непосредственно перед использованием.

Для приготовления H₂O₂/ТМВ раствора, приготовьте 1:1 смешивание цветного реагента А и цветного реагента В за 1 час перед использованием. Тщательно перемешайте. Приготовленный раствор H₂O₂/ТМВ реагент должен быть готов за 15 минут перед использованием и является стабильным при комнатной температуре в темноте до 3 часов. Уничтожьте остаток после использования.

8. ПРОЦЕДУРА 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 по 50 мкл соответствующей референтной сыворотки, контроля и образца пациентов в соответствующие лунки.
3. Внесите 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Осторожно покачайте планшет в течение 20-30 секунд и накройте.
5. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 60 мин.
6. Удалите содержимое лунок. Промойте и опустошите лунки дистиллированной водой 5 раз. Перевернуть планшет на расстеленный 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 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, чтоб голубой цвет полностью изменился на желтый.**
11. Измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм в течении 30 минут.

9. 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 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.

9.1 Пример построения калибровочной кривой

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

FT3 (пг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	2,474
1,2	2,202
2,5	1,884
5,0	1,485
8,5	1,117
18,0	0,710

(См. график в оригинале инструкции).

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Достоверность

Данный набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотироидной, эутироидной и гипертироидной популяции (значения в границах 0,1-14 пг/мл). Общее число образцов 151. Список уравнения квадратной регрессии и коэффициент корреляции были компьютеризированы и сравнены с установленным методом.

Метод	Среднее (x)	Анализ квадратной регрессии	Коэффициент корреляции
Данный метод	3,045	$Y=0,978(x)-0,116$	0,950
Референтный	2,921		

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

10.2 Точность

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

Точность в анализе (в пг/мл)

Образец	N	X	CO	КВ,%
Низкий	24	1,85	0,09	4,9
Нормальный	24	4,49	0,16	3,6
Высокий	24	8,0	0,25	3,1

Точность между анализами (в пг/мл)*

Образец	N	X	CO	КВ,%
Низкий	12	2,16	0,29	13,1
Нормальный	12	5,09	0,40	7,9
Высокий	12	9,13	0,94	10,2

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

10.3 Специфичность

Перекрестная реактивность антитела трийодтиронина к некоторым веществам была оценена при добавлении влияющих веществ в сывороточную матрицу 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
Иодотирозин	< 0,0001	10 мкг/мл
Дийодотирозин	< 0,0001	10 мкг/мл
Дийодотиронин	< 0,0001	10 мкг/мл

10.4 Чувствительность

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

11. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

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

	Взрослые (110 образцов)	Беременные (75 образцов)
Среднее	2,8	3,0
Стандартное отклонение	0,7	0,6
Ожидаемые границы (+2 CO)	1,4-4,2	1,8-4,2

Важно помнить, что установленные границы ожидаемых значений для «нормальной» популяции зависят от многих факторов: специфичность метода, тестируемой популяции, точности метода. Поэтому, каждая лаборатория должна устанавливать собственные границы.

12. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Увеличение концентрации в сыворотке связывающего 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.

13. ОГРАНИЧЕНИЯ 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.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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