

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА (Т4)

3146-15, Free T4 ELISA

Каталог. № : 3146-15 Методика от 04-02-2016
Количество : 96
Производитель: DAI (США)



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

Анализ	Free T4 ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конкурентный ИФА
Диапазон обнаружения	0-7.40 нг/дл
Образец	50 мкл
Специфичность	97 %
Чувствительность	0.314 нг/дл
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12 месяцев от даты производства

НАЗНАЧЕНИЕ

Количественное определение концентрации свободного тироксина в сыворотке человека методом микропланшетного иммуноферментного анализа.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Тироксин (Т4) тиреоидной гормон, который циркулирует в крови, в основном в комплексной форме с протеином-носителем, главным образом тироксин-связанным глобулином (ТВГ). Только свободная (несвязанная) часть Т4 ответственна за биологическую активность. Когда концентрация протеина-носителя растет, при беременности, общий уровень Т4 изменяется, тогда как концентрация свободного Т4 остается в нормальных границах. Поэтому измерение концентрации свободного Т4 больше связано с клиническим статусом, чем уровень общего Т4. Например, рост общего Т4 связанный с беременностью, приемом контрацептивов и эстрогенной терапией, иногда результат уровня общего Т4 находится за нормальными границами, тогда как концентрация свободного Т4 остается в нормальных установленных границах. Маскирование патологической тиреоидной функции может также проявляться при гипер- и гипотиреоидных условиях увеличением концентрации ТВГ. Общий Т4 может быть увеличен и снижен изменениями ТВГ, что есть результатом нормальных установленных уровней. Концентрация свободного Т4 раскрывает актуальный клинический статус пациентов.

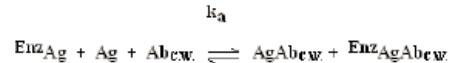
Этот набор методологически предоставляет оптимальную чувствительность, что требуется несколькими техническими манипуляциями. Стандарт сыворотки, образец пациента или контроль сначала добавляется в лунку микропланшета. Добавляется конъюгат энзим-Т4, после чего реактанты смешиваются. Происходит реакция конкурирования между Т4 энзимным конъюгатом и образцом свободного Т4 за ограниченное число связанных антител, иммобилизованных на сторонах лунок. После отделения связанного антитела энзимным конъюгатом Т4 от несвязанного энзимным конъюгатом Т4, активность энзима, присутствующего на поверхности лунки количественно определяется реакцией с субстратом для выработки цвета. Обслуживание нескольких стандартных сывороток с известной концентрацией свободного тироксина дает возможность построение графика активности и концентрации. При сравнении данных соответствующей кривой, активность неизвестных образцов может изменяться в соответствии с концентрацией свободного тироксина.

ПРИНЦИП

Сравнительный иммуноферментный анализ – Аналогичный метод для свободного Т4.

Необходимы точные реагенты для солидной фазы иммуноферментного анализа, включая иммобилизованное антитело, конъюгат ферментного антигена и природный антиген.

После смешивания иммобилизованного антитела, конъюгата энзимного антигена и сыворотки, содержащей природный свободный антиген, происходит реакция конкурирования между природным свободным антигеном и конъюгатом энзимного антигена за ограниченное число переведенных в нерастворимую форму связанных сторон. Взаимодействие ниже иллюстрируется



уравнением:

$\text{Ab}_{\text{c.w.}}$ = моноспецифическое иммобилизованное антитело (константа)

Ag = Природный антиген (сменная величина)

EnzAg = Конъюгат энзимного антигена (константа)

$\text{AgAb}_{\text{c.w.}}$ = Комплекс антиген-антитело

$\text{EnzAgAb}_{\text{c.w.}}$ = Комплекс конъюгат энзимного антигена-антитела

K_a = Степень стабильной ассоциативности

k_a = Степень стабильной диссоциативности

$K = k_a/k_a$ = Стабильное равновесие

После того, как равновесие достигнуто, фракция связанного антитела отделяется от несвязанного антигена декантацией или аспирацией. Активность энзима в фракции связанного антитела обратно пропорциональна концентрации природного свободного антигена. При использовании нескольких разных установленных сывороток с известной концентрацией антигена для построения кривой, можно получить концентрацию антигенов в неизвестных образцах.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами должны быть кровь, сыворотка разных типов. Соберите образцы крови обычной венепункцией при соблюдении необходимых правил безопасности. Для получения точных результатов, необходима утренняя сыворотка пациента, который воздерживается от приема пищи. Кровь нужно собрать в обычную пробирку с красной полоской для венепункции, не используя никаких добавок или гелиевых барьеров. Дайте возможность крови стуситься. Центрифугируйте образец для отделения сыворотки от клеток. Образцы хранить при 2-8 °С максимум до 5 дней. Если нет возможности анализировать образцы в течение 5 дней, они могут храниться замороженными до 30 дней при -20 °С. Избегайте повторного замораживания и размораживания. При анализе в дублях требуется 0,100 мл образца.

РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

- Референтная человеческая сыворотка – 1 мл/фл**
Шесть флаконов референтной сыворотки тироксина с соответствующей **приблизительной** концентрацией 0 (A), 0.40 (B), 1.25 (C), 2.10 (D), 5.0 (E) и 7.40 (F) нг/дл. Хранить при 2-8 °С. Добавлены консерванты. Точный уровень указан на этикетке согласно разным лотам.
Для SI единиц: 1 нг/дл * 12.9 = пмоль/л
- fT4 ферментный реагент – 13 мл/фл**
Один флакон конъюгата тироксин-пероксидазы хрена (HRP) в альбумин-стабилизирующей основе быка. Добавлены консерванты. Хранить при 2-8 °С.
- Микропланшет с лунками, покрытыми антителом, 96 лунок**
Один микропланшет на 96 лунок покрыт анти-тироксин сывороткой овцы, запечатан в алюминиевый пакет с осушителем. Хранить при 2-8 °С.
- Концентрат Промывочного раствора – 20 мл**
Один флакон, содержащий поверхностно-активное вещество в фосфатно-буферном солевом растворе. Добавлены консерванты. Хранить при 2-8 °С.
- Субстрат А – 7 мл/фл**
Одна бутылка, содержащая ТМБ в буфере. Хранить при 2-8 °С.
- Субстрат В – 7 мл/фл**
Одна бутылка, содержащая перекись водорода (H₂O₂) в буфере. Хранить при 2-8 °С.
- Стоп раствор – 8 мл/фл**
Одна бутылка, содержащая сильную кислоту (1N HCl) в буфере. Хранить при 2-30 °С.
- Инструкция пользователя**

Замечание 1: не используйте реагенты после окончания срока пригодности.

Замечание 2: вскрытые реагенты стабильны 60 дней при 2-8 °С.

Замечание 3: вышеуказанные реагенты для одного 96-микропланшета.

Необходимые, но не поставляемые материалы:

- Пипетки, способностью внесения объема 50 и 100 мкл с точностью более чем 1,5%.

- Диспенсер для повторного внесения объема 0,100 мл и 0,350 мл с точностью более чем 1,5%.
- Микропланшетный промыватель или сдавливающая бутылка (по возможности).
- Микропланшетный ридер с длиной волны при 450 нм и 620 нм.
- Абсорбирующая бумага для вытирания лунок.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Промывочный буфер

Разбавьте содержимое промывочного концентрата до объема 1000 мл дистиллированной или неионизированной водой в пригодном для хранения контейнере. Храните при комнатной температуре 2-30 °C до 60 дней.

2. Раствор рабочего субстрата

Перелейте содержимое янтарного флакона «субстрат А» в чистый флакон «субстрат В». Накройте чистый флакон желтой крышечкой, чтобы было легко отличить. Смешайте и храните при 2-8 °C.

Примечание 1: не используйте рабочий субстрат, если он синего цвета.

Примечание 2: не используйте реагенты, если они загрязненные или наблюдается рост бактерий.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед началом анализа приведите все реагенты, референтные сыворотки и контроли к комнатной температуре (20-27° C).

- Приготовьте лунки микропланшета для каждого стандарта сыворотки, контроля и образца для анализа в дубликате. **Не используйте стрипы вставьте назад в алюминиевый пакет, запечатайте и храните при 2-8 °C.**
- Внесите 0,050 мл (50 мкл) соответствующей референтной сыворотки, контроля или образца в помеченные лунки.
- Добавьте 0,100 мл (100 мкл) раствора fT4 ферментного конъюгата в все лунки.
- Покрутите микропланшет осторожно 20-30 секунд для смешивания и накройте.
- Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
- Удалите содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. Промокните планшкетку абсорбирующей бумагой, в случае декантации.
- Добавьте 350 мкл промывочного буфера, декантируйте (спустите и промокните) или аспирируйте. Повторите это два раза, чтоб вместе получилось три промывания. **Может использоваться автоматическое или ручное устройство для промывания. При этом следуйте руководству по эксплуатации производителя для точной процедуры промывания. При использовании бутылки со сдавливанием, наполните каждую лунку при сдавливании контейнера (избегайте воздушных пузырей). Декантируйте промыватель и повторите еще дважды.**
- Добавьте 0,100 мл (100 мкл) рабочего субстрата во все лунки. **Всегда добавлять реагенты в одном порядке для минимизирования расхождения времени реакции между лунками.**

НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА

Инкубируйте при комнатной температуре 15 минут.

- Добавьте 0,050 мл (50 мкл) стоп раствора в каждую лунку и осторожно смешивайте 15-20 секунд. **Всегда добавлять реагенты в одном порядке для минимизирования расхождения времени реакции между лунками.**
- Считайте абсорбцию каждой лунки при 450 нм микропланшетным считывателем (используя установленную длину волны 620-630 нм для минимизации колебаний) в течение 30 мин.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для получения концентрации свободного тироксина в неизвестных образцах используется кривая ответной дозы.

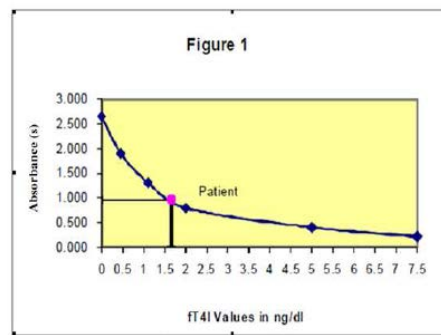
- Пометьте абсорбцию, полученную с распечатки микропланшетного ридера, как указано в примере 1.
- Отметьте точками абсорбцию каждого дубликата стандартной сыворотки против соответствующей концентрации свободного T4 в нг/дл на линейной графической бумаге (не вычисляйте среднее дубликатов стандартов сыворотки).
- Проведите оптимальную кривую через отмеченные точки.
- Для определения концентрации свободного T4 в неизвестных образцах, отметьте среднюю абсорбцию дубликатов каждого неизвестного на вертикальной оси графика, найдите пересекающиеся точки на кривой и считайте концентрацию (в нг/дл) с горизонтальной оси графика (можно вычислить среднее дубликатов неизвестных, как указано). В последующем примере

средняя абсорбция (0,964) пересекается с кривой ответной дозы при концентрации свободного T4 1,65 нг/дл.

Пример 1

Образец	Номер лунки	Абс (A)	Среднее абс. (B)	Значение (нг/дл)
Кал А	A1	2,658	2,612	0,00
	B1	2,566		
Кал В	C1	1,919	1,900	0,45
	D1	1,880		
Кал С	E1	1,339	1,306	1,10
	F1	1,273		
Кал. D	G1	0,769	0,790	2,00
	H1	0,811		
Кал. E	A2	0,396	0,400	5,00
	B2	0,404		
Кал. F	C2	0,215	0,217	7,40
	D2	0,219		
Контр. 1	E2	1,827	1,835	0,50
	F2	1,843		
Контр.2	G2	0,541	0,557	2,70
	H2	0,573		
Пациент	A3	0,951	0,964	1,65
	B3	0,976		

Рисунок 1



Концентрация fT4 (нг/дл)

*Данные, представленные в примере 1, только для иллюстрации и не могут использоваться вместо калибровочной кривой для каждого анализа. Указанные значения для калибраторов являются свойственными для определенной партии.

ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для достоверности результатов, следующие критерии должны приниматься:

- Абсорбция калибратора 0 мкг/дл должна быть $\geq 1,3$
- Четыре из шести совокупностей контролей должны попадать в установленные диапазоны.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

А. Характеристики анализа

- Важно, чтобы время реакции для каждой лунки было стабильно.
- Раскапывание образцов не должно превышать 10 мин.
- Не использовать высоко липемические, гемолизированные и загрязненные образцы.
- Если используется более чем один планшет, необходимо строить еще одну кривую.
- Добавление раствора субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому добавление стоп раствора и субстрата нужно проводить с той самой частотой, чтоб не допускать часовую девиацию во время реакции.
- Планшетный ридер измеряет вертикально. Не дотрагиваться до дна лунок.
- Неправильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.
- Используйте компоненты того самого лота. Не смешивайте реагенты из разных упаковок.
- Точное пипетирование, а также соблюдение установленных точных временных и температурных требований имеют важное значение. Любое отклонение от DAI IFU может дать неточные результаты.
- Все действующие национальные стандарты, правила и законы, должны быть строго соблюдены, чтобы обеспечить правильное использование устройства.

- Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающего устройства, вошера и/или автоматизированного инструментария, используемого с данным устройством.

В. Интерпретация

- Измерения и интерпретация результатов должны быть выполнены квалифицированным профессионалом.**
- Лабораторные результаты сами по себе являются только одним аспектом для определения ухода за пациентом и не должны быть единственным основанием для терапии, особенно если результаты конфликтуют с другими исследованиями.
- Для получения достоверных результатов испытаний, адекватный контроль и другие параметры должны быть в пределах перечисленных диапазонов и требований к анализу.
- Если содержимое наборов изменяется, например, путем смешивания реагентов из разных наборов, что может привести к получению ложных результатов испытаний, или если результаты неверно интерпретированы, DAi не несет никакой ответственности.
- Если используется ПО для интерпретации результатов теста, крайне важно, чтобы прогнозируемые значения калибраторов оказывались в пределах 10% от соответствующих концентраций.
- Если, по некоторым причинам, считываются значения, выше чем наивысший калибратор, подавайте его как есть (т.е. > 7,4 нг/дл). **Не пробуйте разбавлять образец. Вариации TBG в разных матриксах не дает возможности последовательного разбавления свободного Т4.**
- Концентрация тироксина зависит от множества факторов: функционирования тиреоидной железы и ее регуляция, концентрация TBG и связывание тироксина с TBG. Поэтому, концентрация общего тироксина сама по себе не достаточна для характеристики клинического статуса.
- Значения общего тироксина в сыворотке может колебаться под влиянием таких факторов, как беременность или прием контрацептивов. Поэтому следует проводить анализ Т3 для оценки концентрации TBG, что бы установить вызван ли рост Т4 вариацией TBG.
- Уменьшение значения общего тироксина может быть вызвано болезнями недостатка протеина, болезнями печени, приемом тестостерона или других лекарств. Таблица лекарств и условия, что влияют на величины тироксина, наведены в журнале Американской Ассоциации Клинической Химии.
- Интерпретация FT4 усложняется разными лекарствами, что могут влиять на связывание Т4 к протеиновому носителю тиреоидного гормона или влиять на его метаболизм в Т3. При некоторых не-тиреоидных заболеваниях оценка тироида становится особенно тяжелым. Некоторые пациенты этой категории могут страдать от первичного гипотирозидизма или от компенсирующего вторичного гипотирозидизма. В таких случаях рекомендуется оценка чувствительного ТТГ.
- В редких случаях, повязанных с экстремальной вариацией альбумин связывающего способности для Т4 как семейная дисальбуминовая гипертироксинемия (FDH) – прямая оценка свободного Т4 может быть ложной.
- Циркулирование антител к Т4 и гормон связывающих ингибиторов может влиять на характеристики теста.
- Гепарин, как описано, имеет in vivo и in vitro эффекты на уровни свободного Т4. Образцы пациентов, что поддавались гепариновой терапии, должны быть собраны перед обработкой антикоагулянтом.

НЕ ДЛЯ ОБСЛЕДОВАНИЯ НОВОРОЖДЕННЫХ

ОЖИДАЕМЫЕ ДИАПАЗОНЫ ЗНАЧЕНИЙ

Было проведено изучение эутиреоидной взрослой популяции для определения ожидаемых значений этого теста. Результаты наведены в Таблице 1.

Таблица 1

	Взрослые (89 образцов)	Беременные (31 образец)
Среднее	1,40	1,50
Стандартное отклонение	0,30	0,37
Ожидаемые границы	0,8-2,0	0,76-2,24

Важно иметь в виду, что установление диапазона ожидаемых значений для «нормальной» популяции зависит от многих факторов: специфичность метода, тестируемой популяции, точности метода. Поэтому, каждая лаборатория должна устанавливать собственные границы.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

I. Точность

Точность внутри и между анализами была определена при анализе трех разных уровней сыворотки. Полученные данные показаны в Таблицах 2 и 3.

Точность в анализе

Для оценки внутри тестовой точности три образцы сыворотки двадцати репликантов (низкий, средний и высокий диапазон кривой) были проанализированы в одном анализе. Внутри тестовая точность была равна 3,25-10,98%.

Таблица 2

	Низкий (нг/дл)	Средний (нг/дл)	Высокий (нг/дл)
Кол-во	20	20	20
Среднее	0,550	1,740	3,250
СО	0,061	0,074	0,106
КВ, %	10,98	4,26	3,25

Точность между анализами

Для оценки между тестовой точности один дубликат каждого из трех образцов сыворотки (низкий, средний и высокий) был проанализирован в 10 анализах за период 6 месяцев, что включает пять разных наборов реагентов и три разные техники. Между тестовая точность равна 6,01 – 10,81%.

Таблица 3

	Низкий (нг/дл)	Средний (нг/дл)	Высокий (нг/дл)
Кол-во	10	10	10
Среднее	0,480	1,410	3,490
СО	0,052	0,085	0,279
КВ,%	10,81	6,01	7,90

II. Чувствительность

Чувствительность набора составляет 0,314 нг/дл. Чувствительность была получена исходя из вариабильности сыворотки и используя 0 нг/дл калибратора и используя 2СО (95%) для вычисления минимальной дозы.

III. Достоверность

Данный набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотироидной, еутиреоидной и гипертиреоидной популяции (значения в границах 0,1-8 нг/дл). Общее число образцов 197. Список уравнения квадратной регрессии и коэффициент корреляции были компьютеризированы и сравнены с установленным методом.

Таблица 4

Анализ линейной регрессии

Метод	Среднее (x)	Анализ квадратной регрессии	Козфф. корреляции
Данный метод	1,56	$Y=0.1034+0.9525X$	0,920
Референтный	1,59		

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

IV. Специфичность

Перекрестная реактивность антитела тироксина 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 тироксина, необходимой для замещения того самого количества вещества, конъюгата.

Вещество	Перекрестная реактивность	Концентрация
l-тироксин	1,0000	---
d-тироксин	0,9800	10 мкг/дл
d-трийодтиронин	0,0150	100 мкг/дл
l-трийодтиронин	0,0300	100 мкг/дл
Йодотирозин	0,0001	100 мкг/мл
Дийодотирозин	0,0001	100 мкг/мл
Дийодотиронин	0,0001	100 мкг/мл
ТСГ	н/о	40 мкг/мл
Альбумин	н/о	40 мкг/мл
Фенилбутазон	н/о	10 мкг/мл
Фенитоин	н/о	40 мкг/мл
Салицилат	н/о	500 мкг/мл

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли для проверки границ уровней при гипотирозидизме, еутиреоидизме и гипертиреоидизме для мониторинга характеристик анализа. Эти

контроли нужно обрабатывать как неизвестные и определять значения в каждой процедуре теста. Нужно построить таблицу контроля качества для характеристик поставляемых реагентов. Для установлений тенденций, нужно использовать статистические методы изучения пациентов. Каждая лаборатория должна установить границы анализа. Другие параметры, что изучаются при исследовании отрезка 80, 50 и 20% стандартной кривой указывают на воспроизводимость между тестами. Кроме того, максимальная абсорбция не должна противоречить предыдущим результатам. Существенная девиация с установленных характеристик может показывать изменения при экспериментальных условиях или деградации реагентов набора. Свежие реагенты должны быть использованы для определения причины вариаций.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для диагностики "in vitro"

Не для внутреннего или внешнего применения на людях или животных

С реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфекционными.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
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