

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА (FT4)

EIA-2386, Free Tyroxine (fT4) ELISA

Каталог. № : EIA-2386
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 24-10-2011
Версия 16.0



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

НАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации Свободного Тироксина в человеческой сыворотке.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

FT4 является иммуноферментным анализом твердой фазы. Стандарт сыворотки, образец пациента и рабочий реагент Т4 ферментного конъюгата добавляется в лунку микропланшета, покрытого моноклональным Т4 антителом. Происходит реакция конкурентного связывания между ферментным конъюгатом и образцом свободного Т4 за ограниченное число связанных антител, иммобилизованных на сторонах лунок. После 60 минутной инкубации при комнатной температуре, ячейки промываются водой для удаления несвязанного Т4 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 FT4 в образце. Концентрация FT4 в неизвестных образцах количественно определяется согласно серии стандартов FT4.

РЕАГЕНТЫ

Материалы, входящие в состав набора:

- Микропланшет, покрытый антителами (1 планшет, 96 лунок) Микротитрационные лунки, покрытые Анти-Т4
- Реагент Ферментного конъюгата fT4, готов к использованию (1 флакон, 10.5 мл) Содержит Антитела Т4, конъюгированные с пероксидазой хрена, с консервантами
- 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, жидкие, готовы к использованию.
 - Точные концентрации указаны на этикетках каждой отдельной партии
 - Для SI единиц: 1 нг/дл x 12.9 = пмоль/л
- Цветной реагент А (1 бутылка, 13 мл) Содержит перекись водорода в ацетатном буфере
- Цветной реагент В (1 бутылка, 13 мл) Содержит 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМВ), стабилизированный в буферном растворе.
- Стоп-раствор (3N HCl) (1 бутылка, 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 °С максимум 48 часов. Если образцы не будут проанализированы в течении 48 часов, они могут храниться при -20 °С до 30 дней.

ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

Невскрытый набор следует хранить при 2-8 °С 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 измерений 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.

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 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 °С)

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 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. Добавьте по 200 мкл рабочего раствора субстрата в каждую лунку. **Всегда добавляйте реагенты в том самом порядке, чтобы минимизировать разницу реакционным временем лунок.** Аккуратно перемешайте в течение 10 секунд.
8. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение 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 течение 30 минут.

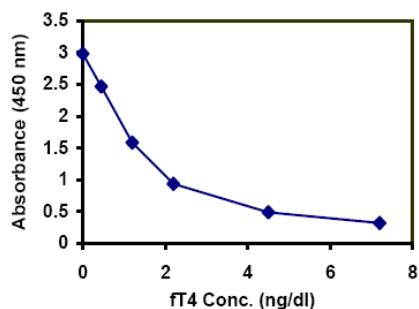
РАСЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

1. Достоверность

Данный набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотиреодной, эутиреодной и гипертиреодной популяции (значения в границах 0.1-8 нг/дл). Общее число образцов 166. Список уравнения квадратной регрессии и коэффициент корреляции были компьютеризированы и сравнены с установленным методом.

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 отличный метод.

2. Точность

Точность в 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 (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%

3. Специфичность

Перекрестная реактивность была рассчитана выведением соотношения между дозой интерферирующего вещества и дозой Тироксина, необходимой для замещения такого же количества конъюгата.

Перекрестно реагирующее вещество	% Перекрестной Реактивности	Концентрация
1-Тироксин (Т4)	100	---
d-Тироксин	98	10 мкг/дл
1-Трийодотиронин (Т3)	3.0	100 мкг/дл
d-Трийодотиронин	1.5	100 мкг/дл
Дийодотиронин	0.01	100 мкг/мл
Дийодотирозин	0.01	100 мкг/мл
Йодотирозин	0.01	100 мкг/мл
Фенитоин	Н/о	40 мкг/мл
Салицилат натрия	Н/о	500 мкг/мл
TBG	Н/о	40 мкг/мл
Альбумин	Н/о	40 мг/мл
Фенилбутазон	Н/о	10 мкг/мл

4. Чувствительность

Чувствительность набора составляет 0.05 нг/дл. Чувствительность была получена исходя из вариабельности сыворотки и используя 0 нг/дл калибратор и 2СО (95%) для вычисления минимальной дозы.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ (в нг/дл)

	Взрослые (89 образцов)	Беременные (31 образец)
Среднее (X)	1.40	1.50
Стандартное отклонение (σ)	0.30	0.37
Ожидаемые границы (±2 σ)	0.8 - 2.0	0.76 - 2.24

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.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Увеличение концентрации в сыворотке связывающего протеина будет показывать соответствующее изменение концентрации общего Т4, тогда как физиологическая активность FT4 остается неизменной в эутиреодных индивидов. Поэтому, определение концентрации FT4 дает более точную оценку тиреодного статуса, чем измерение общего Т4. Повышенный уровень FT4 указывает на гипертиреозидизм, а низкий уровень указывает на гипотиреозидизм.

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.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕВ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76008
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com