



Набор для определения СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА

Кат. № : 101-2386
Количество тестов : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 04-04-2008

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации свободного ТИРОКСИНА в человеческой сыворотке.

ПРИНЦИП

FT4 является твердофазовым иммуноферментным анализом. Стандарт сыворотки, образец пациента и T4 энзимного конъюгата рабочий реагент добавляется в ячейку микропланшета, покрытого моноклональным T4 антителом. Происходит реакция конкурирования между энзимным конъюгатом и образцом свободного T4 за ограниченное число связанных антител, иммобилизованных на сторонах ячеек. 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 энзима и обратно пропорционально количеству немеченого FT4 в образце. Концентрация FT4 в неизвестных образцах количественно определяется согласно серии стандартов FT4.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Материалы, входящие в состав набора:

- Планшет с лунками, покрытыми антителами, 96 лунок.
- T4 энзимный конъюгат концентрат, 10,5 мл, готовый к использованию
- FT4 стандарты, 0, 0,3, 0,95, 2,1, 3,6 и 7,0 нг/дл, 1,0 мл каждый.
- 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 2-8⁰С максимум 48 часов. Если образцы не будут проанализированы в течении 48 часов, они могут храниться при -20⁰С до 30 дней.

ХРАНЕНИЕ НАБОРА И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Невскрытый набор следует хранить при 2-8⁰С 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 0-2ОП или выше при длине волны 450 нм.

ПОДГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Рабочий раствор субстрата – приготовьте немедленно 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 (18-25⁰С)

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 энзимного 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 (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 свободного T4 в нг/дл.

ПРИМЕР ПОСТРОЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

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

FT4 (нг/дл)	ОП (450 нм) Среднее
0	2,496
0,3	2,292

0,95	1,903
2,1	1,295
3,6	0,819
7,0	0,410

ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Достоверность

Данный набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотиреоидной, эутиреоидной и гипертиреоидной популяции (значения в границах 0,1-8 нг/дл). 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	1,5	$Y=0.10+0.952(x)$	0,978
Установленный	1,4		

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

2. Точность

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

Внутри тестовая точность (в пг/мл)

Образец	N	X	CO	KB,
Низкий	16	0,3	0,03	9,8%
Нормальный	16	1,4	0,06	4,5%
Высокий	16	3,6	0,22	6,2%

Между тестовая точность (величины в пг/мл)*

Образец	N	X	CO	KB,
Низкий	10	0,34	0,04	11,5%
Нормальный	10	1,35	0,07	3,7%
Высокий	10	3,69	0,25	4,2%

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

3. Специфичность

Результаты выражены как коэффициент концентрации FT4 к концентрации перекрестного реактанта, что заменяет 50% связанного T4 энзимного конъюгата $\times 100\%$.

Вещество	% Перекрестной реактивности
l-тироксин (T4)	(100)
d-тироксин	100
l-тиротиронин (T3)	4,5
d-тиротиронин	5,4
Дийодтиронин	<0.06
Дийодтирозин	<0.05
Йодотирозин	<0.05
Фенитоин	<0.05
Салицилат натрия	<0.05

4. Влияние эндогенных добавленных лекарств

Концентрация FT4 была определена при присутствии нескольких лекарств, добавленных в сыворотку при приблизительно двойном уровне нормальной терапевтической концентрации сыворотки. % изменения при действующем FT4, обнаруженном при присутствии этих лекарств были измерены и показаны в таблице.

Вещество	Конечная концентрация эндогенных лекарств	% изменения концентрации
Салицилат натрия	40 мг/дл	+ 1,8
Дифенилдантоин	30 мкг/дл	+ 28,0
Пропилтиоирацил	4 мг/дл	+ 18,7
Фенилбутазон	30 мг/дл	+ 0,8

1. Влияние эндогенных эстрогенов

Образцы третьего триместра беременной женщины были проанализированы для определения тироидного статуса общего T4, тироидного статуса и FT4. В 33% образцов, общий уровень T4 был оценен как граничный гипертироидизм, 67% были эутиреоидными. Вычисленный индекс свободного тироксина и концентрация FT4 были в нормальном диапазоне для всех образцов.

2. 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

	Взрослые (110 образцов)	Беременные (30 образцов)
Среднее	1,4	1,5
Стандартное отклонение	0,6	0,7
Ожидаемые границы (+2 CO)	0,8-2,0	0,8-2,2

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 T4, тогда как физиологическая активность FT4 остается неизменной в эутиреоидных индивидов. Поэтому, определение концентрации FT4 дает более точную оценку тироидного статуса, чем измерение общего T4. Повышенный уровень FT4 указывает на гипертироидизм, а низкий уровень указывает на гипотиреоидизм.

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

