



Набор ИФА для определения в сыворотке человека ОБЩЕГО ТРИЙОДИРОНИНА (ТЗ)

Кат. № : E-TT3-1P
Количество тестов : 96
Производитель : Dima Diagnostika (Германия)

Методика от 11-2005

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

ПРИНЦИП

Эффективный иммуноферментный анализ.

Для твердой фазы иммуноферментного анализа требуются определенные реагенты, включая иммобилизованное антитело, конъюгат ферментного антигена и нативный антиген.

После смешивания иммобилизованного антитела, конъюгата ферментного антигена и сыворотки, содержащей нативный антиген, происходит реакция конкурентного связывания между нативным антигеном и конъюгатом ферментного антигена за ограниченное число переведенных в нерастворимую форму связанных сторон.

После того, как равновесие достигнуто, фракция связанного антитела отделяется от несвязанного антигена декантацией или аспирацией. Активность фермента во фракции связанного антитела обратно пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких разных контрольных сывороток с известной концентрацией антигена можно вывести кривую и определить концентрацию антигенов в неизвестных образцах.

РЕАГЕНТЫ ДЛЯ МИКРОПЛАНШЕТА (96 ЛУНОК)

- Контрольные человеческие сыворотки – 0,75 мл/флакон.** Шесть флаконов контрольной сыворотки трийодтиронина с соответствующей концентрацией 0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 10,0 нг/мл.
- Ферментный конъюгат (готов к использованию) – 6 мл/флакон.** Содержит трийодтиронина-пероксидазы хрена конъюгат (HRP) в бычьей альбумин-стабилизирующей матрице. Хранить при 2-8°C.
- Реагент анализа – 6 мл.** Одна бутылочка, содержащая буфер, связанные поглотители протеина и анти ТЗ mAb. Хранить при 2-8°C.
- Микропланшет с покрытыми антителами (готов к использованию), 96 лунок.** Один микропланшет на 96 ячеек покрыт анти-трийодтиронин сывороткой овцы, запечатан в алюминиевый пакет с осушителем. Хранить при 2-8°C.
- Концентрат промывочного раствора – 25 мл.** 40х концентрат. Добавлен консервант. Хранить при 2-30°C.
- ТМВ Субстрат – 12,0 мл (готов к использованию).** Хранить при 2-8°C.
- Стоп раствор – 12,0 мл/флакон.** Один флакон, содержащая сильную кислоту (0,5 N H₂SO₄). Хранить при 2-30°C.

Замечание 1: не используйте реагенты после окончания срока годности.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

С реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфицированными.

Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В, С и ВИЧ 1 и 2. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными. Описание лабораторных процедур поведения с продуктами крови можно найти в изданиях Центра Контроля заболеваний.

ЗАБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови обычной венопункцией 10 мл заборной силиконовой пробиркой при соблюдении необходимых правил безопасности. Кровь нужно собрать в обычную пробирку с красной полоской для венопункции, не используя никаких добавок или

гелевых барьеров. Дайте возможность крови стечь. Центрифугируйте образец для отделения сыворотки от клеток. Образцы могут храниться при 2-8°C до 48 часов. Если образцы не могут быть использованы в течении этого времени, они должны храниться при -20°C до 30 дней. При тестировании в дубликате необходимо 0,10 мл образца. Перекрестная реактивность определена соотношением между дозой вводимого вещества к дозе трийодтиронина, необходимой для вытеснения того же количества трейсера.

Вещество	Перекрестная реактивность (%)
I-Трийодтиронин	100
I-Тироксин	0.37
Обратный ТЗ	0.75
D-Тироксин	0.1
3,5-Диоидо-L-Тирозин	0.2
4-Феноксифенол	0.2

МАТЕРИАЛЫ

Необходимые, но не поставляемые

- Пипетки, способностью внесения объема 50 мкл с точностью более чем 1,5%.
- Диспенсер для повторного внесения объема 0,100 мл и 0,300 мл с точностью более чем 1,5%.
- Микропланшетный вошер или сдавливающая бутылка (по возможности).
- Микропланшетный фотометр на 450 нм длиной волны.
- Абсорбирующая бумага для вытирания ячеек.
- Материалы контроля качества.
- Вакуумный аспиратор (выборочно) для этапов промывания.
- Таймер.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1. Моющий буфер

Разбавьте содержимое моющего концентрата до объема 1000 мл дистиллированной или неионизированной водой в пригодном для хранения контейнере. Храните при комнатной температуре до окончания срока пригодности, указанного на этикетке.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Приведите все реагенты, стандарты, контроли и образцы к комнатной температуре (20-27°C).

- Приготовьте лунки микропланшета для каждого стандарта сыворотки, контроля и образца для парного анализа.
- Пипетируйте **50 мкл** соответствующего стандарта сыворотки, контроля или образца в помеченные лунки.
- Внесите **50 мкл** реагента анализа во все лунки.
- Покрутите осторожно микропланшет 10 сек. чтобы смешать и накрыйте.
- Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-27°C).**
- Добавьте **50 мкл** раствора трийодтиронин-ферментного конъюгата во все лунки.
- Покрутите осторожно микропланшет 10 сек. чтобы смешать и накрыйте.
- Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре (20-27°C).**
- Удалите содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. Промокните планшкетку абсорбирующей бумагой, в случае декантации.
- Добавьте **300 мкл** промывочного буфера (См. раздел Подготовка Реагентов), декантируйте (спустите и промокните) или аспирируйте. Повторите это четыре (4) раза, чтоб вместе получилось пять (5) промывок. Может использоваться автоматическое или ручное устройство для промывки. 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 четырежды (4).
- Добавьте **100 мкл** ТМВ-субстрата во все лунки. Всегда вносите реагенты в том самом порядке для минимизирования расхождения времени реакции между лунками. **Инкубируйте при комнатной температуре 10 мин.** *Время инкубации настроено на 20-27°C. В случае, если комнатная температура выше 27°C, ТМВ-субстрат следует инкубировать только в течение 8 минут (абсорбция 0-стандарта должна быть более чем 2.5).*
- Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую лунку. **Всегда добавляйте реагенты в том же порядке чтобы минимизировать расхождение времени реакции между лунками.**
- Считайте абсорбцию в каждой лунке при 450 нм в микропланшетном фотометре. **Результаты должны**

считаться в течении 10 минут после добавления стоп раствора.

Примечание: При повторном анализе образцов с концентрациями более чем 10 нг/мл, внесите 25 мкл образца и 25 мкл 0 стандарта сыворотки в лунку с образцом (это поддерживает общую концентрацию протеина). Умножьте считанное значение на 2, чтобы получить концентрацию трийодтиронина.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

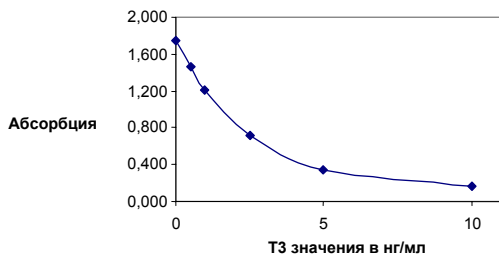
Каждая лаборатория должна анализировать контроли для проверки границ уровней при гипотирозидизме, еутироидизме и гипертирозидизме для мониторинга характеристик анализа. Эти контроли нужно обрабатывать как неизвестные и определять значения в каждой процедуре теста. Нужно построить таблицу контроля качества 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 небольшие изменения при экспериментальных условиях или деградации реагентов набора. Свежие реагенты должны быть использованы для определения причины вариаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения концентрации трийодтиронина в неизвестных образцах используется кривая дозы.

1. Пометьте абсорбцию, полученную с распечатки микропланшетного ридера, как указано в примере 1.
2. Отметьте точками диапазон для каждого дубликата стандартной сыворотки против соответствующей концентрации Т3 в нг/мл на линейной графической бумаге (не вычисляйте среднее дубликатов стандартных сыворотки).
3. Проведите оптимальную кривую через отмеченные точки. Для определения концентрации Т3 в неизвестных образцах, отметьте средний диапазон дубликатов каждого неизвестного на вертикальной оси графика, найдите пересекающиеся точки на кривой и считайте концентрацию (в нг/мл) с горизонтальной оси графика (можно вычислить среднее значение неизвестных дубликатов, как указано). В следующем примере, средняя абсорбция концентрации Т3 - 1.208 (пересекает калибровочную кривую дозы (106 нг/дл) (См. Рис. 1).

Рисунок 1



Пример 1

Номер лунки	Стандарты сыворотки	Абсорбция
1	0,0 нг/мл	1,74
2	0,5 нг/мл	1,47
3	1,0 нг/мл	1,21
4	2,5 нг/мл	0,72
5	5,0 нг/мл	0,35
6	10,0 нг/мл	0,17

Наведенные данные могут быть использованы только для иллюстрации и не для вычисления результатов анализа.

ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Максимальная абсорбция (0 калибратор) = 1,3 - 2,5.

ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

А. Проведение анализа

- Не должны использоваться микробиологически загрязненные, высоко липимические или гемолизированные образцы.
- Важно, что бы время реакции для каждой лунки было стабильно. Пипетирование образцов не должно превышать 10 мин. 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, чтобы не допускать часовую девиацию во время реакции.
- Планшетный ридер измеряет вертикально. Не торкайтесь дна ячеек.
- Не правильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.

В. Интерпретация

- При компьютерной обработке данных для интерпретации результатов, важно, что бы вычисленные значения калибраторов не падали ниже 10% указанной концентрации.
- Известно несколько видов лекарств, влияющих на связывание трийодтиронина с несущим протеином тиродного гормона или его метаболизм к Т3, что усложняет интерпретацию результатов Т3.
- Циркуляция аутоантител Т3 и гормон-связанных ингибиторов имеют также влияние. Гепарин влияет на концентрацию Т3, поэтому не используйте образцы с этим антикоагулянтом.
- При некоторых нетирозидных болезнях (NTI) очень тяжело определить состояние трийодтиронина.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Было проведено исследование эутироидного взрослого населения для определения ожидаемых значений Т3. Результаты наведены в таблице.

Значения Т3 (нг/мл)	Взрослые (105 образцов)
Среднее (X)	1,315
Стандартное отклонение (CO)	0,334
Ожидаемые границы +/- 2 CO	0,49 – 2,02

Важно помнить, что установленные границы ожидаемых значений для «нормального» населения зависит от многих факторов: специфичность метода, исследуемого, точности метода. Поэтому, каждая лаборатория должна устанавливать собственные границы. До того как такие границы установлены, лаборатория должна полагаться на границы, установлены производителем.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

А. Точность

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

Точность внутри анализа (нг/мл)

Образец	Число	Среднее	CO	КВ, %
Низкий	24	2,02	0,04	3,52
Нормальный	24	4,01	0,02	3,01
Высокий	24	5,68	0,02	3,73

Точность между анализами (нг/мл)

В. Тщательность

Данный набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотирозидной, эутироидной и гипертирозидной популяции (значения в границах 0,15-8,0 нг/мл). Общее число использованных образцов 120. Наименьшее уравнение квадратной регрессии и коэффициент корреляции были вычислены для Т3 контрольным методом.

С. Чувствительность

Чувствительность набора составляет 0,1 нг/мл.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 75122
Тел/факс: (0342) 775 612
E-mail: info@diameb.com