



Набор ИФА для определения в сыворотке или плазме человека концентрации СВОБОДНОГО ТРИЙОДИРОНИНА (FT3)

Кат. № : KTO037EW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 03-2009

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментный колориметрический метод для количественного определения концентрации FT3 (свободного трийодтиронина) в человеческой сыворотке и плазме.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Трийодтиронин (Т3), тироидный гормон, циркулирует в крови, в основном со связанным протеином-носителем (>99.5%). Основным носителем протеином является тироксин-связанный глобулин (ТВГ). Только свободная (несвязанная) часть Т3 ответственна за биологическую активность. Когда концентрация протеина-носителя растет при разных клинических условиях, например, при беременности, 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. Стандарт сыворотки, образец пациента или контроль сначала добавляется в лунку микропланшета. Добавляется конъюгат фермент-Т3, после чего реактанты смешиваются. Происходит реакция конкурентирования между ферментным конъюгатом и образцом свободного Т3 за ограниченное число связанных антител, иммобилизованных на сторонах лунок. После отделения связанного антитела ферментным конъюгатом Т3 от несвязанного ферментным конъюгатом Т3, активность фермента, присутствующего на поверхности лунки количественно определяется реакцией с субстратом для выработки цвета.

Обслуживание нескольких стандартных сывороток с известной концентрацией свободного Т3 дает возможность построение графика активности и концентрации. При сравнении данных соответствующей кривой, активность неизвестных образцов может изменяться в соответствии с концентрацией свободного трийодтиронина.

ПРИНЦИП

Конкурентный иммуноферментный анализ – аналог метода для определения свободного Т3. Необходимые реагенты для твердой фазы иммуноферментного анализа включают иммобилизованное антитело Т3, конъюгат ферментного антигена Т3 и антиген нативного свободного Т3. Конъюгат ферментного антигена Т3 не должен иметь никаких измеряемых связей с протеинами сыворотки ТВГ и альбумином. После смешивания иммобилизованного антитела, конъюгата ферментного антигена и сыворотки, содержащей природный свободный антиген, происходит реакция конкурентирования между природным свободным антигеном и конъюгатом ферментного антигена за ограниченное число переведенных в нерастворимую форму связанных сторон. Подано уравнение, иллюстрирующее реакцию (см. оригинал инструкции на англ языке), где

$Ab_{c.w.}$ = моноспецифическое иммобилизованное антитело (константа)

Ag = Природный антиген (сменная величина)

Enz_{Ag} = Конъюгат ферментного антигена (константа)

$AgAb_{c.w.}$ = Комплекс антиген-антитело

$Enz_{AgAb_{c.w.}}$ = Комплекс конъюгат ферментного антигена-антитела

K_a = Степень стабильной ассоциативности

K_a = Степень стабильной диссоциативности

$K = k_a/k_d$ = Равновесие константы

После того, как равновесие достигнуто, фракция связанного антитела отделяется от несвязанного антигена декантацией или аспирацией. Активность фермента 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.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ РЕАГЕНТЫ

- Хранить все реагенты при 2-8°C в темноте.
- Не использовать реагенты по истечении срока годности.
- Открытые реагенты стабильны ТВ течение 60 дней при 2-8°C.
- Реагентов достаточно на 96 лунок.

КАЛИБРАТОРЫ

6 флаконов (1 мл). Калибраторы (референтная сыворотка) свободного трийодтиронина приблизительных* концентраций: 0 - 0.4 - 1.2 - 4.5 - 8.0 и 18.0 пг/мл. Готовы к использованию.

Консервант: 0,0015% проклин 300.

*Точные уровни указаны на этикетках флакона и являются определенными для каждой партии
Для единиц СИ: 1 пг/мл x 1,536 = пмоль/л.

ФЕРМЕНТНЫЙ КОНЪЮГАТ

1 флакон (13 мл), содержащий конъюгат FT3-HRP. Готовый к использованию.

ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ

1 микропланшет из 96 делимых лунок, покрытый анти-FT3 IgG. Перед использованием позволить достичь микропланшету комнатной температуры (20-25°C) и закрыть сразу после использования. После открытия стабилен до окончания срока годности.

РАСТВОР КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

1 флакон (20 мл), содержащий 9 г/л солевого раствора, 1 г/л твин 20. Развести концентрированный раствор дистиллированной или деионизированной водой.

БУФЕР СУБСТРАТА

1 флакон (13 мл), содержащий H₂O₂-ТМБ (0,25 г/л) (избегать любого контакта с кожей). Готовый к использованию.

БЛОКИРУЮЩИЙ РЕАГЕНТ

1 флакон (14 мл), содержащий серную кислоту (0,15 моль/л) (избегать любого контакта с кожей). Готовый к использованию.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дистиллированная вода.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Автоматический дозатор.

Микропланшетный ридер.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Избегать попадания реагента ТМБ/H₂O₂ под прямой солнечный свет, металлы и оксиданты
- Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако, ни один метод не может
- Известно о влиянии некоторых лекарств на связывание трийодтиронина с протеинами, носителями тиреотропного гормона, илина его метаболизм в Т3, что усложняет интерпретацию результатов свободного Т3. Циркулирующие аутоантитела к Т3 и гормоносвязывающие ингибиторы также могут влиять одни на других.
Было зафиксировано, что гепарин ин-виво и ин-витро влияет на концентрацию свободного Т3. Поэтому, не следует проводить забор образцов, в которых использовался этот антикоагулянт.
При тяжелых нетериоидальных заболеваниях оценка тиреоидного состояния становится очень сложной. Измерения ТСГ рекомендуются для проявления тиреоидного нарушения.
Родственные неальбуминемические условия могут привести к ошибочным результатам по отношению при анализе свободного Т3.
- Не предназначен для исследования новорожденных.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Промывочный раствор:

Разбавить содержимое промывочного концентрата 980 мл дистиллированной или деионизированной водой в пригодном для хранения контейнере. Храните при комнатной температуре до окончания срока годности, указанного на этикетке раствора.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови обычной венепункцией при соблюдении необходимых правил безопасности. Кровь нужно собрать в обычную пробирку (10 мл). Центрифугируйте образец для отделения сыворотки от эритроцитов. Образцы могут храниться при 2-8° С до 48 часов. Если образцы не могут быть использованы в течении этого времени, они должны храниться при -20° С до 30 дней. При исследовании в дубликate необходимо 0,10 мл образца.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед началом анализа приведите все реагенты, калибраторы и контроли к комнатной температуре (18-25°С).

1. Приготовьте лунки микропланшета для каждого стандарта сыворотки, контроля и образца для анализа в дубликate. **Не использованные полоски вставьте назад в пакет из фольги, запечатайте и храните при 2-8°С.**
2. Раскапайте 50 мкл соответствующего калибратора, контроля или образца в помеченные лунки.
3. Добавьте 100 мкл раствора ферментного конъюгата во все лунки.
4. Покачайте осторожно микропланшетом 20-30 сек. чтобы перемешать и накройте.
5. Инкубируйте 60 мин. при комнатной температуре.
6. Удалите содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. Промокните планшет промокающей бумагой, в случае декантации.
7. Добавьте 300 мкл промывочного буфера (см. раздел подготовки реагента), декантируйте (постучите и удалите) или аспирируйте. Повторите процедуру еще два (2) раза, чтобы вместе получилось три (3) промывания. Может использоваться автоматическое или ручное устройство для промывания. При этом следуйте руководству по эксплуатации производителя для точной процедуры промывания. При использовании бутылки со сдвливанием, наполните каждую лунку при сдвливании контейнера (избегайте воздушных пузырей). Декантируйте промыватель и повторите еще дважды.
8. Добавьте 100 мкл буфера субстрата во все лунки.
9. Инкубируйте при комнатной температуре 15 мин.
10. Добавьте 100 мкл блокирующего реагента в каждую лунку и аккуратно перемешайте 15 – 20 сек. Всегда добавлять реагенты в одном порядке, чтобы минимизировать разницу времени реакции между лунками.
11. С помощью микропланшетного считывателя измерьте абсорбцию в каждой лунке при 450 нм (при использовании референтной длины волны при 620-630 нм для минимизации дефектности лунок). Результаты должны считаться в течении 30 минут после добавления стоп раствора.

При использовании в процедуре автоматического микропланшетного аппарата компании Radim и/или SEAC, см. соответствующее руководство пользователя.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли для проверки границ уровней при гипотирозидизме, еутироидизме и гипертироидизме 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 установленными характеристиками может показывать небольшие изменения при экспериментальных условиях или деградации реагентов набора. Свежие реагенты должны быть использованы для определения причины вариаций.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

А. Характеристики 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 лунок. Не правильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.

В. Интерпретация

При использовании компьютерной обработки данных для расчета результатов исследования важно. Чтобы предполагаемые значения калибраторов находились в пределах 10% от приписанных концентраций.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средняя абсорбция

Рассчитайте среднее значения абсорбций (Em) каждой точки калибровочной кривой (Кал₀-Кал₅) каждого образца.

Калибровочная кривая

Отложите среднее значение абсорбции калибраторов (Em) против концентрации. По отложенным точкам выведите подходящую кривую кривую (например, 4-параметровую логистическую).

Расчет результатов

Интерполируйте значения образцов на калибровочную кривую, чтобы получить соответствующие значения концентраций в пг/мл.

При использовании в автоматического микропланшетного аппарата компании Radim и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание будет проводиться автоматически при длине волны трех диапазонов: 450, 405 и 620 нм. Таким образом расширяя диапазон кривой.

ОЖИДАЕМЫЕ ДИАПАЗОНЫ ЗНАЧЕНИЙ

Было проведено изучение эутиреоидного взрослого населения для определения ожидаемых значений этого анализа.

	Взрослые	Беременные
Среднее (пг/мл)	2,8	3,0
Стандартное отклонение	0,7	0,6
Диапазон (пг/мл)	1,4-4,2	1,8-4,2

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точность:

А. Повторяемость (в анализе)

Вариация в процедуре была определена исследованием репликатов (16x) двух разных контрольных сывороток в одном анализе. Вариабельность в анализе составила 5,8%.

В. Воспроизводимость (между анализами)

Вариация между процедурами была определена исследованием репликатов трех разных контрольных сывороток двух разных партий. Вариабельность между анализами составила 7,0%.

Чувствительность

Чувствительность набора составляет 0,1 пг/мл. Чувствительность была получена путем использования нулевого при 95% доверительном интервале.

Специфичность

Перекрестная реактивность антитела трийодтиронина к определенным веществам была оценена добавлением влияющего вещества разных концентраций в основу сыворотки. перекрестная реактивность была рассчитана соотношением между дозой влияющего вещества и дозой Т3, необходимой для замещения аналогичного количества конъюгата.

Вещество	Перекрестная реактивность %
I-трийодтиронин	100
I-тироксин	<0.02
Йодтирозин	<0.01
Дийодтирозин	<0.01
Дийодтиронин	<0.01
Фенилбутазон	<0.01
Салицилат натрия	<0.01

Корреляция с референтным методом

Настоящий набор был сравнен с другим имеющимся в продаже набором. Образцы сыворотки 40 женщин и 13 мужчин анализировались обеими тест-системами. Был рассчитана кривая линейной регрессии:

$$y = 0.87x + 0.22$$

$$r = 0.95 \quad (r^2 = 0.93)$$

“Хук-эффект” высокой дозы

В образце не наблюдалось хук-эффекта до 100 пг/мл.

УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться в соответствии с местным законодательством.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com