



Набор ИФА для определения ОБЩЕГО ТИРОКСИНА

Кат. № : T4W-96M
Количество тестов : 96
Производитель : Тeco Diagnostics (США)

Методика от 10-2007

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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор общего тироксина предназначен для количественного определения концентрации общего тироксина (Т4) в сыворотке человека методом ИФА.

Только для использования в исследовательских целях.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Иммуноферментометрический анализ (тип 3)

Необходимые реагенты для проведения твердофазного иммуноанализа включают: иммобилизованное антитело, конъюгат фермента-антигена и нативный антиген.

После смешивания иммобилизованного антитела, конъюгата фермента-антигена и сыворотки с нативным антигеном в определенном количестве нерастворимых зон происходит конкурентная реакция между нативным антигеном и конъюгатом фермента-антигена.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Ферментный реагент Т4** (1,5 мл): один флакон, содержащий конъюгат пероксидазы хрена Т4 в альбумин-стабилизирующей основе. Добавлен консервант. Хранить при 2-8°C.
- Буфер конъюгата Т4** (13 мл): один флакон с буфером, красным красителем. Консервантом и ингибиторами связывания протеина. Хранить при 2-8°C.
- Покрытый Т4 микропланшет:** 96 лунок. Хранить при 2-8°C.
- Концентрат промывочного раствора** (20 мл): один флакон, содержащий ПАВ и буферный солевой раствор. Хранить при 2-30°C.
- Субстрат А** (7 мл): одна бутылка перекиси водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.
- Субстрат В** (7 мл): одна бутылка перекиси водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.
- Стоп раствор** (8 мл): содержащий концентрированную соляную кислоту, одна бутылка перекиси водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.
- Комплект референтных стандартов:** (1,0 мл/флакон). Откалиброванные относительно 0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 и 25,0 нг/мл. Хранить при 2-8°C.

Единицы СИ: нг/мл x 1.536 = нмоль/л.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

- Пипетки для распределения: 25 и 50 мкл.
- Дозаторы для повторного внесения 0,100 и 0,300 мл.
- Микропланшетный промыватель или сдавливающая бутылка.
- Микропланшетный считыватель с длиной волны при 450 и 620 нм.
- Промокательная бумага для осушивания микропланшетных лунок.
- Полиэтиленовая обертка или накрыватель для планшета для этапов инкубации.
- Вакуумный аспиратор (дополнительно) для этапов промывки.
- Таймер.
- Материалы контроля качества.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Набор анализа после получения должен храниться при 2-8°C.
- Держать микролуночки герметично закрытыми в сухом пакете с осушителями.
- Открытые реагенты стабильны в течение 60 дней если хранить при 2-8°C.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Этот набор содержит человеческую сыворотку. Исходные материалы, использованные для изготовления этого набора оказались не реактивными к HBsAg, HIV 1/2 и HCV по результатам

исследований, одобренных FDA. Однако, никакие известные испытания не могут полностью гарантировать отсутствие этих возбудителей инфекции. Таким образом, все продукты человеческой крови, включая серологические образцы, должны рассматриваться как потенциально инфекционные. Профессиональные лабораторные методы для обработки продуктов крови возможно найти в справочнике Центров Контроля Болезней/Национальных Институтов Здоровья "Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских Лабораториях" 2-я редакция, 1988 г..

ЗАБОР И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

Образцами должна служить сыворотка крови, и при заборе методом венопункции необходимо соблюдать обычные меры предосторожности. Для точного сравнения с установленными нормальными значениями, должен быть получен натошак серологический образец. Кровь должна быть собрана в соответствующую пробирку для венопункции. Без консервантов или антикоагулянтов. Позволить крови свернуться. Центрифугировать образец, чтобы отделить сыворотку от красных кровяных телец. Образцы могут быть охлаждены при 2-8°C максимум до пяти (5) дней. Если образец(ы) не может(ут) испытываться в пределах этого времени, образцы могут храниться при -20°C до 30 дней. Избегать повторного замораживания и размораживания. При анализе в дубликate необходимо 0,050 мл образца.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

1. Рабочий реагент А = раствор ферментного конъюгата Т4

Разбавить в соответствующей емкости ферментный конъюгат Т4 1:1 буфером конъюгата общего Т3/Т4. для соблюдения максимальной эффективности анализа реагент должен использоваться в пределах 2 часов.

Общая формула:

Количество требуемого буфера = к-во лунок * 0.1

Необходимый объем фермента Т3 = к-во лунок * 0.01

т.е.: 18 x 0.1 = 1.8 мл буфера конъюгата общего Т3/Т4

18 x 0.01 = 0.18 мл ферментного конъюгата Т4

2. Промывочный буфер

Разбавить в подходящей емкости содержимое промывочного раствора дистиллированной или деионизированной водой до 1000 мл. Хранить при комнатной температуре (20-27°C) до 60 дней.

3. Раствор рабочего субстрата

Вылить содержимое янтарной бутылки с надписью "Solution A" (раствор А) в чистый флакон с надписью "Solution B". Накройте желтым колпачком чистый флакон для простоты идентификации. Перемешать и должным образом пометить. Хранить при 2-8°C.

Внимание: не использовать рабочий субстрат, если это выглядит синим.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

- Расположить лунки микропланшета для каждой референтной сыворотки, контроля и образца пациента для анализа в дублиях. *Верните все неиспользуемые микролуночные стрипы обратно в мешочек из фольги, герметично закройте и храните при 2-8°C.*
- Пипетировать по 25 мкл соответствующей референтной сыворотки, контроля ил образца в определенные лунки.
- Добавить в каждую лунку по 100 мкл рабочего реагента и ферментного реагента Т4. *Очень важно вносить все реагенты ближе ко дну обработанной лунки*
- Осторожно покачать микропланшетом 20-30 сек., чтобы перемешать и накрыть лунки.
- Инкубировать при комнатной температуре в течение 60 минут.
- Удалить содержимое лунок декантацией или аспирацией. При декантации постучать планшетом, осушив о сухую промокательную бумагу.
- Добавить 300 мкл промывочного буфера (см. раздел Подготовка Реагентов), декантировать (постучать и осушить) или произвести аспирацию. Повторить еще 2 раза, в общем количестве 3 промывки.
- Добавить в каждую лунку по 100 мкл раствора рабочего субстрата (см. раздел Подготовка Реагентов). *Всегда добавлять реагенты в одном порядке, чтобы минимизировать разницы времени реакции между лунками.*

ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА ПЛАНШЕТ НЕ ВСТРЯХИВАТЬ

- Инкубировать при комнатной температуре в течение 15 минут.
- Добавить в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку и осторожно перемешать в течение 15-20 секунд. *Всегда*

добавлять реагенты в одном порядке, чтобы минимизировать разницу времени реакции между лунками.

11. Считать абсорбцию каждой лунки при 450 нм (используя референтную длину волны 620-630 нм для минимизирования неточности лунок) с помощью планшет-ридера.

Внимание: для повторного анализа образцов с концентрациями более чем 25 мкг/дл, раскапайте по 12.5 мкл образца и 12.5 мкл 0 референтного стандарта в каждую лунку образца (содержащий протеин одинаковой концентрации. Умножить результаты на 2, чтобы получить концентрацию.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кривая реактивной дозы используется, чтобы установить концентрацию T4 в неизвестных образцах.

1. Сделать запись абсорбции, полученную из распечатки микропланшетного ридера как указано в Примере 1.
2. Изобразите меру поглощения света каждого дубликата референтной сыворотки против соответствующей концентрации T4 в мкг/дл на линейной миллиметровой (не усреднять дубликаты значений референтной сыворотки перед изображением).
3. Нарисуйте сквозь изображенные точки наилучшую кривую.
4. Для определения концентрации T4 для неизвестных, расположите среднее число абсорбции дубликатов каждого неизвестного значения на вертикальной оси графика, найдите пересекающуюся точку на кривой, и считайте концентрацию в нг/мл с горизонтальной оси графика (дубликаты неизвестных могут быть усреднены как указано). В последующем примере средняя абсорбция (1.022) пересекается с кривой реактивной дозы при концентрации T4 8 мкг/дл (см. Рисунок 1).

(Таблицу и рисунок см. в оригинале инструкции).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли низкого, нормального и повышенного уровня для отслеживания эффективности анализа. Эти контроли должны рассматриваться как неизвестные и значения определяться в каждой процедуре анализа. Диаграммы контроля качества должны сохраняться, чтобы следовать за деятельностью поставляемых реагентов. Подходящие статистические методы должны использоваться, чтобы установить тенденции. Значительное отклонение от установленной деятельности может указывать на незначительное изменение в экспериментальных условиях или на ухудшение качества реагентов набора. Новые реагенты должны использоваться, чтобы определить причину изменений.

Примечания:

1. Мера поглощения света (ОП) калибратора F должна быть ≥ 1.3 .
2. Четыре из шести объединений контроля качества должны быть в пределах установленных диапазонов.

ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Работоспособность анализа

1. Важно, чтобы время реакции в каждой лунке было стабильным для обеспечения воспроизводимости результатов. Пипетирование образцов не должно занимать более десяти (10) минут, чтобы избежать отклонения в анализе. При использовании более одного планшета, рекомендуется повторить кривую реактивной дозы.
2. Добавление раствора субстрата вызывает кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп-раствора. Плэтому. Добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в той же самой последовательности, чтобы избежать любое отклонение во времени реакции.
3. Спектрофотометры считывают вертикально. Не касаться дна лунок.
4. Неудаление соответствующего раствора в в этапах аспирации или декантации может привести к низкому воспроизведению и сомнительным результатам.
5. Образцы, которые загрязнены микробиологически, не должны использоваться в анализе. Высоко липемические или гемолизированные образцы также не должны использоваться.

B. Интерпретация

1. Если используется контролируемая компьютером обработка данных для интерпретации результатов исследования необходимо, чтобы предполагаемые значения калибраторов находились в пределах 10 % от приписанных концентраций.
2. Концентрация общего тироксина в сыворотке зависит от множества факторов: функции щитовидной железы и ее регуляции, концентрации тироксин связывающего глобулина (ТВГ), и связывания тироксина с ТВГ. Таким образом, отдельно взятой концентрации общего тироксина недостаточно для оценки клинического состояния.

Уменьшение значений общего тироксина обнаруживается при болезнях, связанных с потерей белка, определенных болезнях печени и вызванных введением тестостерона, дифенилгидрацией или салицилатами.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Таблица 1

Ожидаемые значения для набора T4 ELISA Test

	Мужчина (N = 42)	Женщина (N = 58)
Среднее (X)	7.6	8.2
Стандартное отклонение (σ)	1.6	1.7
Ожидаемые диапазоны ($\pm 2\sigma$)	4.4-10.8	4.8-11.6

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Точность

Точность в пределах и между процедурами анализа настоящего набора были определены исследованиями трех различных уровней контрольных сывороток. Количество, среднее значение, среднеквадратичное отклонение и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток представлены в Таблице 2 и 3.

Таблица 2
Точность в анализе (значения в ММЕ/мл)

Образец	К-во	X	σ	КВ
Уровень	16	3.1	0.21	6.7%
Уровень	16	8.9	0.27	3.0%
Уровень	16	16.5	0.73	4.4%

Таблица 3
Точность между анализами (значения в ММЕ/мл)

Образец	К-во	X	σ	КВ
Уровень	10	3.0	0.25	8.3%
Уровень	10	8.7	0.32	3.7%
Уровень	10	16.3	0.6S	4.2%

Чувствительность

Процедура на определение ФСГ имеет чувствительность 0.04 мкг/дл.

Точность

Процедура настоящего набора была сравнена с референтным методом ИФА. Испытывались биологические образцы в пределах начиная с низких, нормальных и повышенных концентраций. Общее количество испытываемых образцов было 131. Полученные данные показаны в Таблице 4.

Таблица 4

Метод	Среднее	Наименьшая квадрат. регрессия	Кoeffициент корреляции
Настоящий метод (Y)	8.07	Y = 0.39 + 0.952 (X)	0.934
Референтный (X)	8.06		

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

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