

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИИОДИРОНИНА (tT3)

**125-300, tT3**

Каталог. № : 125-300

Методика от 06-11-2012

Количество : 96

Версия 3

Производитель: **Monobind Inc., (США)**



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

## ВВЕДЕНИЕ

Исследование концентрации трийодтиронина (T<sub>3</sub>) в сыворотке крови рассматривается как важный диагностический тест *in vitro* для оценки тиреоидной дисфункции. Что доказывалось тем обстоятельством, что совершенствование методологии получало значительный стимул в последние два десятилетия.

Появление моноспецифической антисыворотки и открытие блокирующих агентов T<sub>3</sub> связывающих сывороточных белков сделали возможной рутинную процедуру радиоиммуноанализа. (1,2).

Технология ИФА обеспечивает оптимальную чувствительность при минимуме технических приемов.

В этом методе в ячейки планшета вначале добавляются стандарты, исследуемые образцы и контроли. Затем добавляется ферментный-T<sub>3</sub> конъюгат, и реактивы перемешиваются. Происходит конкурентная реакция между нативным трийодтиронином и ферментным конъюгатом за ограниченное количество мест связывания антител, иммобилизованных в ячейках.

После окончания инкубации связавшийся с антителами ферментный-T<sub>3</sub> конъюгат отделяется от несвязавшегося аспирацией. Активность фермента в лунках определяется количественно в реакции с субстратным реактивом по развивающейся окраске раствора.

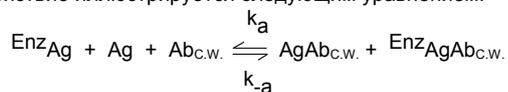
Использование различных стандартов T<sub>3</sub> позволяет построить график зависимости активности фермента от концентрации. Сравнивая активность неизвестного образца, можно рассчитать концентрацию tT<sub>3</sub> в нем.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Конкурентный иммуноанализ (тип 5).

Настоящие реагенты, требующиеся для твердофазного иммуноферментного анализа, включают иммобилизованные антитела, конъюгат фермента с антигеном и нативный антиген. В процессе анализа при взаимодействии ячеек, покрытых антителами, конъюгата фермент-антиген и нативного антигена, содержащегося в сыворотке, происходит конкуренция между антигеном образца и конъюгатом фермент-антиген за ограниченное число иммобилизованных сайтов связывания.

Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



Ab<sub>c.w.</sub> = моноспецифические иммобилизованные антитела (постоянное количество)

Ag = нативный антиген (переменное количество)

EnzAg = конъюгат фермент-антиген (постоянное количество)

AgAb<sub>c.w.</sub> = комплекс антиген-антитело

EnzAg Ab<sub>c.w.</sub> = комплекс конъюгат - антитела

k<sub>a</sub> = константа скорости ассоциации

k<sub>-a</sub> = константа скорости диссоциации

K = k<sub>a</sub> / k<sub>-a</sub> = константа равновесия

После достижения равновесия фракция связанных антител отделяется от несвязанных антигенов декантацией или аспирацией. Активность фермента во фракции связанных антител обратно пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится

калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация неизвестных образцов.

## РЕАГЕНТЫ ДЛЯ 96-ЛУНОЧНОГО ПЛАНШЕТА

- A. А. Референсная человеческая сыворотка - 1 мл во флаконе**  
Шесть флаконов референсной сыворотки (калибраторов) с концентрациями tT<sub>3</sub> 0 (A), 0.5 (B), 1.0 (C), 2.5 (D), 5.0 (E) и 7.5 (F) нг/мл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.  
Фактор конверсии: нг/мл x 1,536 = нмоль/л
- B. Фермент-T<sub>3</sub> конъюгат - 1.5 мл во флаконе**  
Один флакон, содержащий конъюгат трийодтиронин-пероксидаза хрена в растворе альбумина - стабилизирующей матрице. Содержит консервант. Хранить при 2-8°C.
- C. Буфер ферментного конъюгата - 13 мл во флаконе**  
Один флакон, содержащий буфер, красный краситель, консервант и белок-связывающий ингибитор. Хранить при 2-8°C.
- D. Планшет с привитыми антителами - 96 ячеек**  
Один 96-луночный микропланшет, покрытый овечьей анти-T<sub>3</sub> сывороткой и запечатанный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.
- E. Концентрат промывочного раствора - 20 мл**  
Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30°C.
- F. Субстрат А - 7 мл во флаконе**  
Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.
- G. Субстрат В - 7 мл во флаконе**  
Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.
- H. Стоп-раствор - 8 мл во флаконе**  
Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.

Замечание 1. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Замечание 2. Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8°C.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ МАТЕРИАЛЫ

1. Микродозаторы на 50 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 300 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Микропланшетный вошер
4. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 нм и 620 нм.
5. Сосуды для приготовления Рабочего раствора конъюгата и субстратного раствора
5. Фильтровальная бумага для высушивания микроячеек.
6. Пластиковая пленка или крышка для инкубирования микропланшета.
7. Вакуумный аспиратор (опционально) для промывки.
8. Таймер.
9. Контрольные материалы (поставляются ЗАО БиоХимМак, Москва, тел. (495)-647-2740).

## ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

**Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.**

**Не для внутреннего или наружного использования на людях или животных.**

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или, например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

## СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцами служит сыворотка крови. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу.

Образцы могут храниться при 2-8°C до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до

-20 °С на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания - оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.100 мл сыворотки.

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. **Рабочий реагент А - Раствор ТЗ-ферментного конъюгата.** Разбавьте конъюгат ТЗ-фермент 1:11 буфером ферментного конъюгата в подходящей емкости. Например, смешайте 160 мкл конъюгата с 1,6 мл буфера для 16 ячеек (получится небольшой избыток раствора). Этот раствор должен быть использован в течение 24 часов. Хранить при 2-8°C.

##### Основная формула:

Требуемое количество буфера = количество ячеек x 0,1

Необходимое количество конъюгата = n ячеек x 0,01

т.е. = 16 x 0,1 = 1,6 мл для буфера ферментного конъюгата

16 x 0,01 = 0,16 мл (160 мкл) для конъюгата ТЗ-фермент

2. **Промывочный раствор.** Вылейте содержимое концентрата промывочного буфера в сосуд объемом 1000 мл. Разбавьте до 1000 мл дистиллированной водой. Храните при комнатной температуре (20-27°C) до 60 дней.

3. **Рабочий субстратный раствор.** Вылейте содержимое коричневого флакона с пометкой «Раствор А» в прозрачный флакон с пометкой «Раствор В». Закройте желтой крышкой прозрачный флакон для легкой идентификации. Перемешайте и пометьте флакон. Хранить при 2-8°C.

**Замечание:** не используйте Рабочий субстратный раствор, если он приобрел голубую окраску.

#### ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-30°C).

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Храните при 2-8°C.**
2. Добавьте пипеткой по 50 мкл стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
3. Добавьте пипеткой по 100 мкл Рабочего реагента А (раствора ТЗ-ферментного конъюгата) в каждую лунку (см. раздел "Приготовление реагентов").
4. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд и накройте его пластиковой пленкой.
5. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
6. Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
7. Добавьте 300 мкл промывочного буфера (см. раздел "Приготовление реагентов") и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).
8. Добавьте пипеткой по 100 мкл субстратного реагента в каждую лунку (см. "Приготовление реагентов"). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках. Не встряхивайте планшет после добавления субстрата.**
9. Инкубируйте 15 мин при комнатной температуре.
10. Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**
11. Измерьте величины поглощения содержимого ячеек при 450 нм. (Измерение проводите при референсной длине волны 620-630 нм). Измерения должны быть проведены в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

**Замечание:** Для повторного анализа образцов с концентрацией более, чем 7.5 нг/мл, добавьте 25 мкл образца и 25 мкл нулевой (0) референсной сыворотки в лунки (для поддержания постоянной концентрации белка). Полученный результат следует умножить на 2.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли, соответствующие гипо-, гипер и эутиреоидному диапазонам для отслеживания характеристик набора. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться

карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации tT3 в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

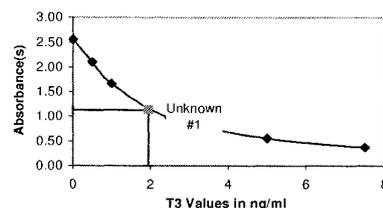
1. Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации tT3 в нг/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
3. Проведите оптимальную калибровочную кривую по построенным точкам.
4. Определите неизвестные концентрации tT3 в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция 1.130 пересекает стандартную кривую при 1.95 нг/дл (см. рис.1)

#### Пример 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция	Среднее абсорбции (В)	Концентрация нг/мл
Калибратор А	A1	2.604	2.556	0
	B1	2.507		
Калибратор В	C1	2.073	2.101	0.5
	D1	2.128		
Калибратор С	E1	1.678	1.662	1.0
	F1	1.646		
Калибратор D	G1	0.954	0.966	2.5
	H1	0.969		
Калибратор E	A2	0.550	0.551	5.0
	B2	0.551		
Калибратор F	C2	0.372	0.370	7.5
	D2	0.369		
Контроль 1	E2	1.701	1.726	0.92
	F2	1.638		
Контроль 2	G2	0.755	0.734	3.58
	H2	0.791		
Образец	A3	1.145	1.130	1.95
	B3	1.115		

\* Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и не должны использоваться для построения стандартной кривой.

Рисунок 1



#### Параметры контроля качества

1. Оптическая плотность Калибратора 0 нг/мл  $\geq 1.3$
2. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

##### А. Качество набора

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
2. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
3. Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
4. Добавление субстратного раствора инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности для устранения различий во времени реакции в разных лунках.

- Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микрочаек.
- Плохая промывка ячеек (неполное удаление раствора во время аспирации) может приводить к невоспроизводимым и недостоверным результатам.
- Используйте компоненты только из одного лота. Не смешивайте реагенты из разных партий.

#### В. Интерпретация результатов

- Если для обработки результатов теста используется компьютер, то рассчитываемые значения стандартов не должны отклоняться более чем на 10% от приписанных значений концентрации.
- Концентрация tT3 зависит от множества факторов: функции цитовидной железы и её регуляции, концентрации тироксин связывающего глобулина (ТСГ) и связывания Т3 с ТСГ (3,4). Таким образом, определение одной лишь концентрации ТТ3 не является достаточным для оценки клинического статуса.
- Пониженные уровни общего трийодтиронина наблюдаются при некоторых болезнях, связанных с потерей белка, болезнях печени, приеме тестостерона, дифенилгидантоина или салицилатов. Более подробно об интерференции лекарственных средств - в специальных изданиях.

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Было проведено исследование взрослой эутиреоидной популяции этим набором (n=105) и получены следующие результаты:

**Таблица 1**  
Ожидаемые значения для ТТ3 в нг/мл

Среднее (X)	1.184
Стандартное отклонение (S.D.)	0.334
Ожидаемый диапазон ( $\pm$ S.D.)	0.52-1.85

Важно иметь в виду, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

##### А. Воспроизводимость.

Воспроизводимость набора на tT3 внутри серии и между сериями определялась в анализе пулов сывороток трех разных уровней. Число, значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

**Таблица 2**  
Воспроизводимость внутри серии (Значения в нг/мл)

Образец	N	X	S.D.	C.V.
Низкий	16	0.78	0.06	7.9%
Нормальный	16	1.92	0.10	5.4%
Высокий	16	3.55	0.14	3.9%

**Таблица 3**  
Воспроизводимость между сериями (в нг/мл)

Образец	N*	X	S.D.	C.V.
Низкий	10	0.76	0.07	8.9%
Нормальный	10	1.85	0.13	6.7%
Высокий	10	3.43	0.16	4.5%

\*Измерения проводились в 10 постановках в дублях в течение 10 дней.

##### В. Точность

Настоящий метод сравнивался с референсным радиоиммунным методом. Использовались образцы от лиц из гипотиреоидной, эутиреоидной и гипертиреоидной популяций (диапазон значений от 0.15 до 8.0 нг/мл). Общее число образцов было 120. Было выведено уравнение линейной регрессии ( $y=mx+b$ ) и был рассчитан коэффициент корреляции для tT3 AccuBind™ ELISA в сравнении с референсным методом. Полученные данные приведены в таблице 4.

**Таблица 4**

Метод	Среднее (x)	Уравнение	Козф. корр.
Этот метод	1.62	$Y = 3.8 + 0.947 (x)$	0.987
Референсный	1.68		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и референс-метода, что доказывают близкие средние значения. Уравнение и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

##### С. Специфичность

Перекрестные реакции анти-Т3 антител с различными веществами оценивались добавлением мешающих веществ в различных концентрациях к сывороточной матрице. Кросс-реактивность рассчитывалась как отношение между дозой мешающего вещества и дозой Т3, требуемого для замещения этого количества вещества.

Вещество	Кросс-реактивность	Концентрация
I-Трийодтиронин	1.000	-
I-Тироксин	< 0.0002	10 мкг/мл
Иодотирозин	< 0.0001	10 мкг/мл
Диодотирозин	< 0.0001	10 мкг/мл
Диодотиронин	< 0.0001	10 мкг/мл
Фенилбутазон	< 0.0001	10 мкг/мл
Салицилат натрия	< 0.0001	10 мкг/мл

##### Д. Чувствительность

Чувствительность метода – 0.04 нг/мл.

Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (нг/мл) плюс  $2\sigma$  ( $\sigma$  - стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)