



## ТЕСТ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ СВОБОДНОГО ТРИЙОДИРОНИНА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ТВЕРДОФАЗНОГО АНАЛИЗА (ИФА)

Тест для определения свободного трийодтиронина в сыворотке крови человека

Кат.№ 3148Z  
Производитель: Diagnostic Automatic, Inc., (США)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

Методика от 10-10-2009

### ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Количество тестов	96 тестов
Тест	Свободный Т3 ELISA
Метод	ИФА: Твердофазный иммуносорбентный анализ
Принцип	Конкурентный ИФА
Диапазон обнаружения	0-16 пг/мл
Образец	50 мкл
Специфичность	97 %
Чувствительность	0,05 пг/мл
Общее время	~ 75 мин.
Срок хранения	12-14 мес.

\*Лабораторные анализы не могут быть единственными критериями для медицинского заключения. История болезни пациента и последующие тесты должны быть приняты во внимание

### НАЗНАЧЕНИЕ

Количественное определение концентрации свободного трийодтиронина в человеческой сыворотке с помощью планшетного ИФА. Считается, что уровни свободного Т3 отображают количество Т3 в клетках, поэтому могут определить клиническое метаболическое состояние Т3.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

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 энзим-Т3, после чего реактанты смешиваются. Происходит реакция конкурирования между энзимным конъюгатом и образцом свободного Т3 за ограниченное число связанных антител, иммобилизованных на сторонах ячеек. После отделения связанного антитела энзимным конъюгатом Т3 от несвязанного энзимным конъюгатом Т3, активность энзима, 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 – аналогичный метод для свободного Т3.

Необходимы точные реагенты для твердой фазы иммуноферментного анализа, включая иммобилизованное антитело Т3, конъюгат ферментного антигена Т3 и свободный Т3 антиген. Конъюгат ферментного антигена Т3 не должен иметь никаких измеряемых связей с протеинами сыворотки ТВГ и альбумину.

После смешивания иммобилизованного антитела, конъюгата ферментного антигена и сыворотки, содержащей природный свободный антиген, происходит реакция конкурирования между природным свободным антигеном и конъюгатом ферментного антигена за ограниченное число переведенных в нерастворимую форму связанных сторон. Подано уравнение, иллюстрирующее реакцию (смтр. 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

$K_d$  = Степень стабильной диссоциативности

$K = k_a/k_d$  = Стабильное равновесие

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

### РЕАГЕНТЫ

#### Поставляемые материалы

**A. Референтные сыворотки человека – 1,0 мл/фл - значки А-Ф.**  
Шесть флаконов установленной сыворотки трийодтиронина с соответствующей концентрацией 0 (А), 1,0 (В), 3,0(С), 5,0 (D), 8,0 (Е) и 16,0 (F) пг/мл. Хранить при 2-8°C. Добавлены консерванты. Точный уровень указан на этикетке согласно разным лотам.

Для SI единицы: 1 пг/мл \* 1,536 = пмоль/л

**В. FT3 ферментный реагент – 13 мл/фл.**

Один флакон конъюгата трийодтиронин-пероксидаза хрена (HRP) в альбумин-стабилизирующей основе быка. Добавлен консервант. Хранить при 2-8°C.

**С. Планшет, покрытый антителами к Т3, 96 лунок.**

Один микропланшет на 96 ячеек покрыт анти-трийодтиронин сывороткой овцы, запечатан в алюминиевый мешочек с осушителем. Хранить при 2-8°C.

**D. Концентрат промывочного раствора – 20 мл.**

Один флакон, содержащий поверхностно-активное вещество в фосфатно-буферном солевом растворе. Добавлен консервант. Хранить при 2-30°C.

**E. Субстрат А – 7,0 мл/фл.** Одна бутылка, содержащая ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.

**F. Субстрат В – 7,0 мл/фл.** Одна бутылка, содержащая перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в буфере. Хранить при 2-8°C.

**G. Стоп раствор – 8,0 мл/фл.** Одна бутылка, содержащая сильную кислоту (1N HCl) в буфере. Хранить при 2-30°C.

**H. Инструкция пользователя.**

#### Необходимые, но не поставляемые материалы

1. Пипетки, способностью внесения объема 50 мкл с точностью более чем 1,5%.
2. Диспенсер для повторного внесения объема 0,100 мл и 0,300 мл с точностью более чем 1,5%.
3. Микропланшетный промыватель или сдавливающая бутылка (по возможности).
4. Микропланшетный считыватель с длиной волны ОП 450 и 620 нм.
5. Промокательная бумага для промокания лунок микропланшета.
6. Полиэтиленовая обертка или микропланшетный накрыватель для этапов инкубации
7. Вакуумный аспиратор (по возможности) для этапов промывания.
8. Таймер.
9. Материалы контроля качества.

**Замечание 1:** не используйте реагенты после окончания срока годности.

**Замечание 2:** вскрытые реагенты стабильны 60 дней при 2-8°C.

**ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Только для использования в диагностике in-vitro  
Не для внутреннего или внешнего применения на людях или животных

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 и ВИЧ. 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.

**СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**

Соберите образцы крови обычной венопункцией 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° С до 48 часов. Если образцы не могут быть использованы в течение этого времени, они должны храниться при -20° С до 30 дней. При тестировании в дубликаты необходимо 0,10 мл образца.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ****1. Промывочный буфер**

Разбавьте содержимое промывочного концентрата до объема 1000 мл дистиллированной или неионизированной водой в пригодном для хранения контейнере. Храните при комнатной температуре (20~27°С) максимально до 60 дней.

**2. Раствор рабочего субстрата**

Вылейте содержимое янтарной бутылки, помеченной как раствор А в чистый флакон, помеченный как раствор В. Чистый флакон накройте желтым колпачком, чтобы легко различать. Перемешайте и пометьте соответственно. Храните при 2-8°С.

**Примечание:** не используйте рабочий субстрат если он синего цвета.

**ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

Перед началом анализа приведите все реагенты, сыворотку стандарты и контроли к комнатной температуре (20-27°С).

1. Приготовьте лунки микропланшета для каждого стандарта сыворотки, контроля и образца для анализа в дубликаты. **Не использованные полоски вставьте назад в пакет из фольги, запечатайте и храните при 2-8°С.**
2. Пипетировать 0,050 мл (50 мкл) соответствующей референтной сыворотки, контроля или образца в помеченные лунки.
3. Добавьте 0,100 мл (100 мкл) раствора fT3 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 сдавливанием, наполните каждую лунку при сдавливании контейнера (избегайте воздушных пузырей). Декантируйте промыватель и повторите еще дважды.
8. Добавьте 0,100 мл (100 мкл) раствора рабочего субстрата во все лунки в том самом порядке для минимизирования расхождения времени реакции между лунками. **НЕ ВСТРЯХИВАТЬ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА**
9. Инкубируйте при комнатной температуре 15 мин.
10. Добавьте 0.050 мл (50 мкл) стоп раствора 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.**

**КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

Каждая лаборатория должна анализировать контроли для проверки границ уровней при гипотирозидизме, эутироидизме 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.

**ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Для получения концентрации свободного трийодтиронина в неизвестных образцах используется кривая ответной дозы.

1. Пометьте абсорбцию, полученную с распечатки микропланшетного считывателя, как указано в примере 1.
2. Отметьте абсорбцию для каждого дубликата стандартной сыворотки против соответствующей концентрации свободного Т3 в пг/мл на линейной графической бумаге (не вычисляйте среднее дубликатов стандартов сыворотки).
3. Проведите оптимальную кривую через отмеченные точки.
4. Для определения концентрации свободного Т3 в неизвестных образцах, отметьте среднюю абсорбцию дубликатов каждого неизвестного на вертикальной оси графика (дубликаты неизвестного могут быть усреднены как указано ниже). В последующем примере средняя абсорбция составляет 1,855 (пересекает калибровочную кривую в 2,1 пг/мл концентрации свободного Т3).

**Пример 1**

Образец	Номер лунки	Абс (А)	Среднее Абс (В)	Значение* (пг/мл)
Кал А	A1	2,658	2,579	0,0
	B1	2,531		
Кал В	C1	2,264	2,248	1,0
	D1	2,233		
Кал С	E1	1,570	1,578	3,0
	F1	1,585		
Кал. D	G1	1,124	1,135	5,0
	H1	1,145		
Кал. E	A2	0,749	0,748	8,0
	B2	0,748		
Кал. F	C2	0,463	0,463	16,0
	D2	0,462		
Пациент	E2	1,860	1,855	2,1
	F2	1,849		

Приведенные данные только для иллюстрации и не могут использоваться для вычисления результатов анализа.

**Прписанные значения калибраторов зависят от их серии.**  
(Пример калибровочной кривой см. в оригинале инструкции)

**ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА**

Для того, чтобы результаты анализов считались действительными, они должны соответствовать следующим критериям:

1. Абсорбция ОП калибратора А должна составлять  $\geq 1.3$ .
2. Четыре из 6 объединений контролей качества должны находиться в установленных пределах.

**ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ****А. Характеристики анализа**

1. Не должны использоваться микробиологически загрязненные, высоко липимические или гемолизированные образцы.
2. 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.
3. 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.
4. Планшетный ридер измеряет вертикально. Не торкайтесь дна ячеек.
5. Не правильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.

**В. Интерпретация**

1. При компьютерной обработке данных для интерпретации результатов, важно, что бы вычисленные значения калибраторов не падали ниже 10% указанной концентрации.
2. Если считаются результаты пациентов, по некоторым причинам, выше, чем наивысший калибратор, подавайте для отчета этот калибратор как таковой (напр. >16 пг/мл). Не пытайтесь разбавлять образец. TBG вариация в разных матриксах не дает возможности последовательно разбавлять гормон FT3.
3. Известно несколько видов лекарств, влияющих на связывание трийодтиронина с несущим протеином тироидного гормона или его метаболизм к T3, что усложняет интерпретацию результатов свободного T3.
4. Циркуляция аутоантител T3 и гормон-связанных ингибиторов имеют также влияние.
5. Гепарин влияет на концентрацию свободного T3, поэтому не используйте образцы с этим антикоагулянтом.
6. При некоторых нетироидных болезнях (NTI), определение тироидного статуса очень тяжело. Рекомендуется измерение ТТГ для идентификации тироидной дисфункции.
7. Аналогичные дисальбуминовые условия могут вызывать ошибочные результаты при прямых анализах свободного T3.

**НЕ ДЛЯ ОБСЛЕДОВАНИЯ НОВОРОЖДЕННЫХ****ОЖИДАЕМЫЕ ДИАПАЗОНЫ ЗНАЧЕНИЙ**

Было проведено изучение эутиреоидного взрослого населения для определения ожидаемых значений этого теста. Результаты наведены в Таблице 1.

**Таблица 1**

Ожидаемые значения для свободного T3 системы ИФА в пг/мл

	<b>Взрослые (110 образцов)</b>	<b>Беременные (75 образцов)</b>
Среднее	2,8	3,0
Стандартное отклонение (σ)	0,7	0,6
Ожидаемые диапазоны (+/-2σ)	1,4-4,2	1,8-4,2

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. До того как такие границы установлены, лаборатория должна полагаться на границы, установлены производителем.

**РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****А. Точность**

Точность внутри и между анализами была определена при анализе трех разных уровней объединенных контрольных сывороток. Полученные данные показаны в Таблицах 2 и 3.

**Таблица 2** Точность в анализе (значения в пг/мл)

<b>Образец</b>	<b>Кол-во</b>	<b>Среднее</b>	<b>СО</b>	<b>КВ, %</b>
Низкий	24	1,85	0,09	4,9
Нормальный	24	4,49	0,16	3,6
Высокий	24	8,00	0,25	3,1

**Таблица 3** Точность между анализами (значения в пг/мл)

<b>Образец</b>	<b>Кол-во</b>	<b>Среднее</b>	<b>СО</b>	<b>КВ, %</b>
Низкий	12	2,16	0,29	13,1
Нормальный	12	5,09	0,40	7,9
Высокий	12	9,13	0,94	10,2

\*Все измерения проводились в 12 экспериментах в дубликате.

**В. Соответствие**

Настоящий набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотироидной, эутиреоидной и гипертиреоидной популяции (значения в границах 0,1-14 пг/мл). Общее число образцов 151. Список уравнения квадратной регрессии и коэффициент корреляции были компьютеризированы и сравнены с установленным методом. Полученные данные показаны Таблице 4.

**Таблица 4**

<b>Метод</b>	<b>Среднее (x)</b>	<b>Анализ наименьшей квадратной регрессии</b>	<b>Козфф. корреляции</b>
Данный метод (Y)	3,05	$y=0,35+0,922(x)$	0,902
Референсный (X)	2,92		

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

**С. Чувствительность**

Чувствительность набора составляет 0,05 пг/мл. Чувствительность была получена исходя из вариабельности сыворотки и используя 0 пг/мл калибратора и используя 2СО (95%) для вычисления минимальной дозы.

**Д. Специфичность**

Перекрестная реактивность антитела трийодтиронина к определенным веществам была оценена добавлением влияющего вещества разных концентраций в основу сыворотки.

<b>Вещество</b>	<b>Перекрестная реактивность</b>	<b>Концентрация</b>
I-трийодтиронин	1.0000	-
I-тироксин	<0.0002	10 мкг/мл
Йодтирозин	<0.0001	10 мкг/мл
Дийодтирозин	<0.0001	10 мкг/мл
Дийодтиронин	<0.0001	10 мкг/мл
Фенилбутазон	<0.0001	10 мкг/мл
Салицилат натрия	<0.0001	10 мкг/мл

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

ООО «ДИАМЕБ»

Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.ua

www.diameb.ua