

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ САЙТІВ ЗВ'ЯЗУВАННЯ, ДОСТУПНИХ ДЛЯ ТИРЕОЇДНИХ ГОРМОНІВ, В СИРОВАТЦІ АБО ПЛАЗМІ ЛЮДИНИ

### 3176-15, T3-Uptake ELISA

Каталог. №: 3176-15

Методика від 04-22-2013

Кількість : 96

Виробник : DAI, (США)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

#### ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Кількість тестів	96 тестів
Тест	T3-Uptake ELISA
Метод	ІФА
Принцип	Конкурентний ELISA
Діапазон визначення	18-47 % U
Зразок	50 мкл
Специфічність	Не визначено
Чутливість	Не визначено
Загальний час	~ 75 хвилин
Термін придатності	12-14 місяців

#### ПРИЗНАЧЕННЯ

Вимірювання загальної кількості сайтів зв'язування, доступних для тиреоїдних гормонів, в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного імуоферментного аналізу.

**РЕЗЮМЕ І ОПИС** (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

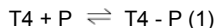
#### ПРИНЦИП ТЕСТУ

Конкурентний імуоферментний аналіз (ТИП 5):

Необхідними компонентами для оцінки зв'язуючої здібності сироватки крові людини є: кон'югат фермент-Т3, тироксин, зв'язуючий білок (P), і іммобілізоване антитіло тироксину (Ab).

При змішуванні ферментного кон'югату і тироксину із зразком відбувається зв'язуюча реакція між білками пацієнта і доданим тироксином, **але не з ферментним кон'югатом**.

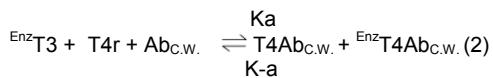
Ця взаємодія представлена нижче:



T4 = Доданий Тироксин (постійна величина)

P = Специфічні зв'язуючі протеїни (змінна величина)

Доданий Тироксин (T4), не використаний в реакції 1, потім конкурує з кон'югатом фермент-Т3 за обмежену кількість нерозчинних сайтів зв'язування. Взаємодія описується таким рівнянням:



Ab<sub>c.w.</sub> = Іммобілізовані антитіла (постійна величина)

T4r = Доданий T4, не використаний в реакції (1) (змінна величина)

<sup>Enz</sup>T3 = Кон'югат фермент-антиген (постійна величина)

T4Ab<sub>c.w.</sub> = Комплекс Тироксин-антитіло

<sup>Enz</sup>T3 Ab<sub>c.w.</sub> = Комплекс Кон'югату фермент-Т3 з антитілом

Ka = Постійна асоціації

K-a = Постійна дисоціації

K = Ka / K -a = Постійна рівноваги

Після досягнення рівноваги, фракція пов'язаного антитіла відділяється від незв'язаного ферменту-антигена за допомогою декантування або аспірації. Активність ферментів у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна зв'язуючій здатності зразка. Таким чином, при гіпотиреозі зв'язуючі білки є відносно ненасиченими (через низький рівень гормонів щитовидної залози), що призводить до збільшення споживання доданого тироксину, ніж

еутиреоїдного зразка. Це призводить до підвищеного зв'язування кон'югату фермент-трийодтиронін, викликаного зниженою концентрацією доступного тироксину. При гіпертиреозі відбувається зворотня реакція. Зв'язуючі білки відносно насичені тироксином (через високий рівень гормонів щитовидної залози), що призводить до зниження споживання доданого тироксину. Залишковий тироксин відносно набагато вище, ніж еутиреоїдний зразок, призводить до зниження зв'язування антитіл фермент-тироксин через зростання конкуренції тироксину за обмежену кількість сайтів антитіл.

#### РЕАГЕНТИ

**Матеріали, які входять до складу набору:**

- Людські контрольні сироватки - 1 мл/флакон (A – D)**  
Чотири (4) флакони сироватки зі зв'язуючою здатністю ненасичених гормонів щитовидної залози **приблизного\*** рівня 18 (A), 25 (B), 35 (C), і 47 (D) % U. Зберігати при температурі 2-8 °C. Консервант був доданий.  
\*Точні рівні вказані на етикетках.
- Реагент Т3 Ферментного захоплення - 1.5 мл/флакон**  
Один (1) флакон кон'югату Трийодтиронін-пероксидаза хрому (HRP) і тироксину в альбумін-стабілізуючій матриці. Консервант був доданий. Зберігати при температурі 2-8 °C.
- Буфер Кон'югату Т3-захоплення - 13 мл**  
Одна (1) пляшка реагенту, що містить буфер, помаранчевий барвник і консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.
- Планшет, покритий антитілами Т4 - 96 лунок**  
Один 96-луночковий мікропланшет, покритий сироваткою анти-тироксину вівці, та упакований в алюмінієвий пакет з осушувачем. Зберігати при температурі 2-8 °C.
- Промивний розчин – 20 мл**  
Одна(1) пробірка, що містить сурфактант в буферному розчині. Консервант був доданий. Зберігати при температурі 2-30 °C.
- Субстрат А – 7 мл/флакон (S)**  
Один (1) флакон, що містить Тетраметилбензидин (ТМВ) в буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C.
- Субстрат В – 7 мл/флакон (S)**
- Стоп-розчин – 8 мл/флакон**  
Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при температурі 2-30 °C.
- Вкладиш Інструкції**

**Необхідні матеріали, що не входять до набору**

- Піпетки зі здатністю внесення об'єму 25 мкл з точністю краще, ніж 1.5%.
- Диспенсер (и) для повторних внесень об'ємів 0.100 мл і 0.350 мл з точністю, більше ніж 1.5%.
- Регульовані Диспенсер (и) для внесення об'ємів (20-200 мкл) і (200-1000 мкл) для розведення кон'югату і субстрату.
- Мікропланшетний вошер або пластикова бутиль (опційно).
- Зчитувач мікропланшетів з довжиною хвилі 450 нм і 620 нм.
- Тестові пробірки для розведення ферментного кон'югату і субстратів А і В.
- Абсорбуючий папір для декантування лунок мікропланшетів.
- Плівка або кришка для проведення інкубації.
- Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання.
- Таймер.
- Матеріали Контролю якості.

**Примітка 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

**Примітка 2:** Відкриті реагенти стабільні протягом 60 (шістдесяти) днів при температурі 2-8 °C.

**Примітка 3:** Реагенти призначені для використання з 96 лунками.

#### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах.**

Було встановлено, що всі продукти, які містять сироватку крові людини, мають негативну реакцію на Поверхневий антиген гепатиту В, ВІЛ-1 і 2 та антитіла до вірусу гепатиту. Оскільки жоден тест не може дати повної гарантії відсутності інфекційних агентів, всю людську сироватку слід вважати потенційно небезпечною і здатною передавати захворювання.

#### ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразками повинні бути кров, сироватка або плазма за типом і звичайні застережні заходи повинні бути дотримані при заборі крові з вени. Для точного порівняння з контрольними значеннями, необхідно отримати ранішні зразки крові натще. Кров повинна бути зібрана в пробірки без добавок або антикоагулянтів (для сироватки) або в вакуумні пробірки, що містять гепарин або ЕДТА. Дайте крові згорнутися в зразках сироватки. Центрифугувати зразок для відділення сироватки або плазми з клітин.

Проби можуть зберігатися в холодильнику при температурі 2-8 °С протягом не більше 5 (п'яти) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °С до 30 днів. Уникати повторного заморожування і відтавання. При тестуванні в дублях необхідно 0.05 мл розведеного зразка.

## ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Робочий реагент F - Розчину реагенту Т3U-фермент

Розвести Кон'югат Т3U-фермент 1:11 з Буфером Кон'югату Т3U в підходящій ємності. Наприклад, розвести 160 мкл Кон'югату з 1.6 мл буфера для 16 лунок (невеликий надлишок розчину залишиться). Цей реагент слід використати протягом двадцяти чотирьох годин для досягнення максимальної продуктивності аналізу. Зберігати при температурі 2-8 °С.

Загальна формула:

Необхідний об'єм Буфера = Кількість лунок \* 0.1

Необхідна Кількість Кон'югату Т3-фермент = Кількість лунок \* 0.01

наприклад = 16 x 0.1 = 1.6 мл для Буфера Загального Т3/Т4

16 x 0.01 = 0.16 мл (160 мкл) для Т3 кон'югату

### 2. Промивний буфер

Розбавте вміст розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою в підходящій ємності для зберігання. Зберігати при кімнатній температурі 2-30 °С протягом 60 днів.

### 3. Робочий розчин

Вилити вміст флакону А в чистий флакон з міткою В. Закрити жовтою кришкою для полегшення ідентифікації. Перемішати і відповідно позначити. Зберігати при температурі 2-8 °С.

**Примітка 1:** Не використовуйте робочий субстрат, якщо він синього кольору.

**Примітка 2:** Не використовувати реагенти, які забруднені або мають зростання бактерій.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перед проведенням тесту, доведіть все реагенти, контролю і калібраторні сироватки до кімнатної температури (20 - 27 °С).

1. Підготувати лунки мікропланшетів для сироваткових калібраторів, контролей і зразків пацієнта для аналізу в дублікатах.

**Помістити невикористані смужки назад в алюмінієву упаковку, закрийте і зберігайте при температурі 2-8 °С.**

2. Внести 0.025 мл (25 мкл) відповідних сироваткових калібраторів, контролей або зразків у відповідні лунки.

3. Додати 0.100 мл (100 мкл) робочого реагенту А, Розчину Т3U-фермент в кожен лунку.

4. Обережно повертати планшет протягом 20-30 секунд для перемішування і накрити плівкою.

5. Інкубувати 60 хвилин при кімнатній температурі.

6. Видалити вміст мікропланшетів декантацією або аспірацією. У разі декантування промокнути планшет абсорбуючим папером.

7. Додати 350 мкл розчину для промивання (див. розділ про підготовку реагентів), декантувати або аспірувати. Повторити два (2) рази, щоб було в цілому три (3) промивання.

**Автоматичне або ручне промивання можна використовувати. Виконувати інструкції виробника з експлуатації. Якщо використовується пластикова бутиль, наповнити кожен лунку стискуванням бутілі (уникаючи утворення повітряних бульбашок). Декантувати і повторити два (2) рази.**

8. Додати 0.100 мл (100 мкл) Розчину робочого субстрату в усі лунки (див. розділ про підготовку реагентів). **Завжди додавати реагенти в такому ж порядку, щоб мінімізувати відмінності в часі реакції між лунками. НЕ ТРЯСТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ.**

9. Інкубувати при кімнатній температурі протягом 15 (п'ятнадцяти) хвилин.

10. Додати 0.050 мл (50 мкл) стоп-розчину в кожен лунку і обережно перемішати протягом 15-20 секунд. **Завжди додавати реагенти в такому ж порядку, щоб мінімізувати відмінності в часі реакції між лунками.**

11. Зчитати абсорбцію в кожній лунці при 450 нм (використовуючи контрольну довжину хвилі 620-630 нм, щоб мінімізувати недоліки). Вимірювання повинно проводитися протягом тридцяти (30) хвилин після зупинки реакції.

## ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Крива використовується для з'ясування ненасичених щитовидної зв'язує здібності в невідомих зразках.

1. Виміряти абсорбцію отриману з роздруківки мікропланшетом, як описано у прикладі 1.

2. Позначте точками абсорбцію кожного дубліката стандартної сироватки проти відповідної % поглинання Т3 (U%) на міліметровому папері (чи не середне дублікатів стандартів сироватки змові).

3. З'єднаємо точки з найбільш підходящу криву.

4. Для визначення % Т3-поглинання в невідомих зразках, відзначте середню абсорбцію дублікатів кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайти точку перетину з опорної реакції і прочитати % Т-поглинання (%U) з горизонтальної осі графіка (дублікатів препаратів з невідомою можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі, середня щільність (1,690) перетинає криву посилення на 26,6 % U (див. Малюнок 1).

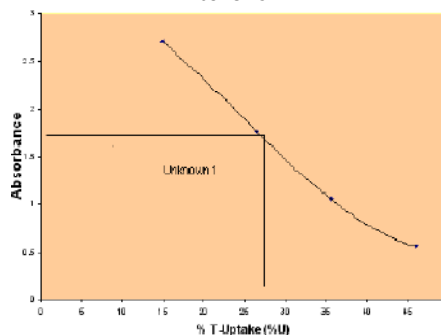
**Примітка:** Комп'ютер обробки даних програмного забезпечення, призначеного для ІФА також можуть бути використані для зменшення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмне забезпечення має бути встановлено.

### ПРИКЛАД 1

Взорець	№ лунки	Абс. (A)	Середнє Абс. (B)	%U
Кал. А	A1	2.644	2.622	18
	B1	2.600		
Кал. В	C1	1.888	1.880	25
	D1	1.872		
Кал. С	E1	0.710	0.718	35
	F1	0.726		
Кал. D	G1	0.265	0.256	47
	H1	0.247		
Контр.1	A2	1.701	1.690	26.6
	B2	1.680		
Контр.2	C2	0.330	0.314	45.5
	D2	0.298		

\* Дані, представлені в Прикладі1 і Малюнку1, призначені тільки для ілюстрації і **не повинні** бути використані замість калібрувальної кривої, побудованої для кожного аналізу. TU також може бути виражене у вигляді співвідношення TU. Розділити %U на 30%, щоб перетворити в TU коефіцієнт. Див Приклад 2:

### ПРИКЛАД: 27.3% U / 30% = 0.910 Малюнок 1



## ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Для того, щоб результати аналізу вважалися дійсними, наступні критерії повинні бути виконані:

1. Абсорбція (OD) калібратора А повинна бути  $\geq 1.3$ .
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні знаходитися у встановленому діапазоні.

## ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ

1. Важливо, щоб час реакції в кожній лунці підтримувався постійним для досягнення відтворюваних результатів.
2. Піпетування проб не повинно займати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути зсуву результатів тесту.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один (1) планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання розчину субстрату проковує кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп-розчину. Таким чином, субстрат і стоп-розчин мають додаватися в тій же послідовності, щоб усунути будь-які тимчасові відхилення в ході реакції.
6. Планшетний рідер вимірює вертикально. Не торкатися нижньої частини лунок.
7. Недотримання етапу видалення розчину аспірацією або декантування може призвести до неточних результатів.
8. Використовуйте компоненти з тієї ж партії. Не змішуйте реагенти з різних партій.

- Точне піпетування, а також дотримання часових проміжків і температурних вимог є суттєвими. Будь-яке відхилення від вказаних інструкцій може привести до неточних результатів.
- Всі діючі національні стандарти, правила і закони, в тому числі, але не обмежуючись, хороші лабораторні процедури, повинні строго дотримуватись для забезпечення дотримання та правильного використання пристрою.
- Важливо калібрувати все обладнання, наприклад, Піпетки, читачі, вошери та/або автоматизовані інструменти, які використовуються, і виконувати рутинне профілактичне обслуговування.

#### В. Інтерпретація

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинна виконуватися кваліфікованим професіоналом.
- Лабораторні результати самі по собі є тільки одним аспектом для призначення лікування пацієнту і не повинні бути єдиною основою для терапії, особливо якщо результати конфліктують з іншими визначеннями.
- Для коректних результатів випробувань, адекватні значення контролей та інші параметри повинні бути в межах зазначеного діапазону і вимог аналізу.
- Якщо тест-системи змінюються, наприклад, шляхом змішування частин з різних наборів, що може спотворити результати тесту, або якщо результати неправильно інтерпретовані, DAI не несе ніякої відповідальності.
- Якщо комп'ютерні програми використовуються для інтерпретації результатів тесту, потрібно, щоб прогнозовані значення калібраторів опинялися в межах 10% від відповідних концентрацій.
- Результати тесту ТЗУ залежать від безлічі факторів: щитовидна залоза і її регуляція, концентрація тироксин зв'язуючого глобуліну (ТЗГ) і зв'язування тиреоїдних гормонів з ТЗГ. Таким чином, тільки результати ТЗ не є достатніми для оцінки клінічного статусу.
- Індекс вільного тироксину (FTI), який є результатом співвідношення TU і загальної концентрації тироксину, отримав широке визнання в якості клінічної більш точної оцінки функції щитовидної залози (9).

#### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю в низькому, нормальному і високому діапазонах для моніторингу проведення аналізу. Ці Контролі повинні розглядатися як невідомі зразки і значення повинні визначатися в кожній процедурі тесту. Дані Контролю якості повинні зберігатися для подальшої перевірки реагентів, що поставляються. Відповідні статистичні методи варто використовувати для з'ясування тенденцій. Кожна лабораторія повинна встановити власні межі аналізу. Крім того, максимальне поглинання має узгоджуватися з попередніми даними. Значне відхилення від показників вказує на непомічену зміну в умовах проведення аналізу або деградацію реагентів в наборі. Свіжі реагенти повинні бути використані, щоб визначити причину відхилень.

#### ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Вивчення еутиреоїдного дорослого населення (85 зразків) було проведено, щоб визначити очікувані значення для Т-поглинання і результати представлені в таблиці 1.

Thyroid Status	%T-Uptake	T-Ratio
Euthyroid	25-35	0.83-1.17
[Hypothyroid or TBG excess binding]	<25	<0.83
[Hyperthyroid or TBG saturation]	>35	>1.17

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можуть бути визначені даним методом для "нормального" населення, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках аналітика. З цієї причини кожна лабораторія повинна використовувати діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки не буде встановлено власний діапазон шляхом аналізів взірців людей, характерних для району, в якому розташована лабораторія.

#### РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### А. Точність

Точність системи даного тесту в аналізі і між аналізами оцінювалася за допомогою аналізів на трьох різних рівнях контрольної сироватки. Кількість, середнє значення, стандартне відхилення і коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 2 і Таблиці 3.

Таблиця 2  
Точність в аналізі (%U)

Взірець	n	X	SD	CV, %
Низький	24	28.7	0.39	1.37
Нормальний	24	37.8	0.51	1.36
Високий	24	45.4	0.33	0.73

Таблиця 3  
Точність між аналізами (%U)

Взірець	n	X	SD	CV, %
Низький	10	28.4	0.45	1.6
Нормальний	10	37.1	0.65	1.8
Високий	10	45.7	0.52	1.1

\* Дані отримані в десяти експериментах у двох примірниках протягом десяти днів.

##### В. Точність

Дана тестова система порівнювалася з радіоімунним методом. Біологічні зразки від гіпотиреоїдних, еутиреоїдних і гіпертиреоїдних вагітних пацієнтів були використані (значення варіювали від 14% до 48%U). Загальна кількість досліджених взірців 120. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції були розраховані для даного методу в порівнянні із звичайним методом. Отримані дані представлені в таблиці 4.

Таблиця 4  
Рівняння найменших квадратів

Метод	Середнє (X)	Аналіз	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	29.3	$Y=1.56 + 0.956(X)$	0.972
Референтний	29.0		

Тільки незначна неузгодженість між цим методом і стандартним методом спостерігалася. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують відмінну узгодженість методів.



#### ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 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)