



Набор для определения ТИРОТРОПНОГО ГОРМОНА

Кат. № : 101-4171
Количество тестов : 96
Производитель : DRG

Методика от 04-2006
Версия 2.0

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации тиротропина в человеческой сыворотке.

ПРИНЦИП

Иммуноферментный анализ:

Необходимые реагенты для иммуноферментного анализа включают высокоаффинные и специфические антитела (энзимные и иммобилизованные) с разным и отдельным использованием эпитопа, в избытке, и нативный антиген. В этой процедуре имеет место иммобилизация во время анализа на поверхности микропланшета через взаимодействие анти-ТТГ, привитого к ячейкам и эндогенно добавленное моноклональное анти-ТТГ антитело. После смешивания имеет место реакция между фиксированным моноклональным антителом, энзимно-меченным вторичным антителом. Реакция между нативным антигеном и антителами, без конкурирования или стерической помехи для формирования сэндвич комплекса. После того, как достигнуто равновесие, антитело-связанная фракция отделяется от несвязанного антигена декантацией или аспирацией. Энзимная активность в антитело-связанной фракции прямо пропорционально концентрации нативного антигена. При использовании нескольких разных установленных сывороток с известным значением антигена, строится стандартная кривая из которой могут быть получены неизвестные образцы.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Материалы, входящие в состав набора:

- Тиротропин стандарты: 0,4 мл/ea (0,2 мл/ea), шесть флаконов TSH антигена при уровнях 0(A), 0,25(B), 0,75(C), 2(D), 5(E) и 15 (F) мЕ/л
- Тиротропин контроль – 0,4 мл/фл. (0,2 мл/ea), концентрации смтр. на этикетке.
- Энзимный конъюгат (готовый к использованию 12 (6) мл/фл.
- Микропланшет – 96 ячеек
- Концентрат моющего раствора – 25 мл (40 крато)
- ТМВ субстрат 12 мл (готовый к использованию)
- Стоп раствор – 12 мл, 1 бутылка, содержащая кислоту (0,25 моль/л H₂SO₄)

Примечание 1: не используйте реагенты после окончания срока пригодности.

Для диагностики in vitro

Не для внутреннего или внешнего использования на человеке или животных.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Использованные сыворотки или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно-опасным материалом.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови обычной венопункцией при соблюдении необходимых правил безопасности. Для получения точных результатов, необходима утренняя сыворотка пациента, который воздерживается от приема пищи. 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 сыворотки могут храниться в холоде при 2-8°C максимум 5 дней. Если образцы не будут проанализированы в течении этого времени, они могут храниться при -20°C до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания и размораживания. При анализе в дубликате, требуется 0,100 мл образца.

МАТЕРИАЛЫ

Поставляемые

1. Шесть флаконов тиротропин калибраторов сыворотки (включая нулевой калибратор).
2. 1 флакон контроля тиротропина.
3. Один флакон реагента антитела, меченного антитела..
4. Один микропланшет на 96 ячеек покрытый
5. Одна бутылка концентрата моющего буфера.
6. Одна бутылка субстрата.
7. Одна бутылка стоп раствора.
8. Инструкция.

Материалы, не входящие в состав поставки:

- Пипетки для внесения 25 мкл и 100 мкл с точностью выше, чем 1,5 %.
- Диспенсер для повторного внесения 0,100 мл и 0,300 мл с точностью выше, чем 1,5%.
- Микропланшетный вошер и сдавливающая бутылка (необязательно)
- Микропланшетный ридер при 450 нм
- Диспенсер регулируемого объема (200-1000 мкл) для разбавления реагента.
- Контейнер для смешивания реагента
- Абсорбирующая бумага для вытирания ячеек.
- Пластиковая обертка или микропланшетный накрыватель для шага инкубации.
- Вакуумный аспиратор (по возможности) для шага промывания.
- Таймер.
- Контейнер для хранения моющего буфера.
- Материалы контроля качества.

ПОДГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Моющий буфер

Разбавьте содержимое моющего концентрата до объема 1000 мл дистиллированной или неионизированной водой в пригодном для хранения контейнере. Храните при комнатной температуре.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед процедурой приведите все реагенты, стандарты и контроли к комнатной температуре (20-30°C)

1. Приготовьте микропланшет для анализа стандартов, контроля и сывороток пациента в дубле. **Остальные неиспользованные стрипы поместите в алюминиевый пакет, запечатайте и храните при 2-8°C.**
2. Внесите 25 мкл стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. **Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре.**
4. Внесите 100 мкл Конъюгата в каждую лунку.
5. Тщательно перемешайте содержимое лунок в течении 10 секунд и накройте.
6. Инкубируйте при комнатной температуре в течении **90 мин.**
7. Удалите содержимое лунок аспирацией или декантацией. Переверните на абсорбирующую бумагу и высушите.
8. Добавьте **приблизительно 300 мкл** моющего раствора, декантируйте или аспирируйте. Повторите еще 4 раза для общего числа 5. **Может использоваться автоматический или ручной вошер. Следуйте инструкции производителя для использования. Если используется сдавливающая бутылка, наполните каждую ячейку и декантируйте промывающий раствор и повторите еще два раза.**
9. Добавьте **100 мкл** ТМВ/раствор субстрата во все ячейки. **Всегда добавляйте реагенты в том самом порядке, что б минимизировать разницу во времени реакции между ячейками.**
10. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течении **20 минут.**
11. Добавьте **100 мкл** Стоп Раствора в каждую лунку. **Всегда добавляйте реагенты в том самом порядке, что б минимизировать разницу во времени реакции между ячейками.**
12. Измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм.

Результаты следует считать в течении пяти минут после добавления стоп раствора. Желательно считать немедленно после остановки реакции, ОП450 может незначительно уменьшиться со временем.

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 установленной тенденции, 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 изменения при экспериментальных условиях или деградации реагентов набора. Свежие реагенты должны быть использованы для определения причины вариаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения концентрации тиротропина в неизвестных образцах используется кривая.

1. Пометьте абсорбцию полученную с распечатки микропланшетного ридера, как указано в примере 1.
2. Отметьте точками абсорбцию каждого дубликата стандартной сыворотки против соответствующей концентрации TSH в мЕ/л на линейной графической бумаге (не вычисляйте среднее дубликатов стандартов сыворотки).
3. Проведите оптимальную кривую через отмеченные точки.
4. Для определения концентрации TSH в неизвестных образцах, отметьте среднюю абсорбцию дубликатов каждого неизвестного на вертикальной оси графика, найдите пересекающиеся точки на кривой и считайте концентрацию (в мЕ/л) с горизонтальной оси графика (можно вычислить среднее дубликатов неизвестных, как указано).
В следующем примере средняя абсорбция равна 1,019 (пересекает стандартную кривую при 15,3 мЕ/л концентрации TSH).

Примечание: Компьютерная обработка данных, разработанная для IEMA анализа также может использоваться для обработки данных.

Пример 1

ИНКУБАЦИОННОЕ ВРЕМЯ 90 минут

Ячейка	Стандарт сыворотки, мЕ/л	Абсорбция
1	0,0	0,014
2	0,0	0,011
3	0,25	0,031
4	0,25	0,037
5	0,75	0,091
6	0,75	0,077
9	2	0,271
10	2	0,259
13	5	0,598
14	5	0,633
15	15	1,853
16	15	1,776

Неизвестные			Среднее	
Ячейка	I.D.	ОП	ОП	Значение
15	Неизвестный 1	0,412		
16	Неизвестный 1	0,424	0,418	3,6 мЕ/мл

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

ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Максимальная абсорбция (15 мЕ/л) = 1,4-2,8

ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ**Характеристики анализа**

- Важно, что бы время реакции для каждой ячейки было стабильно.
- Пипетирование образцов не должно превышать 10 мин. Если используется более чем один планшет, необходимо строить еще одну кривую.
- Не должны использоваться в анализе образцы с микробиологическим загрязнением, а также высоко липемические или гемолизированные образцы.
- Добавление раствора субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому добавление стоп раствора и субстрата нужно проводить с той самой частотой, что бы не допускать часовую девиацию во время реакции.
- Планшетный ридер измеряет вертикально. Не торкайтесь дна ячеек.
- Не правильное удаление раствора при аспирации или декантации на шаге промывания может привести к неточным результатам.
- Образцы пациента с концентрацией TSH выше 40 мЕ/л могут быть разбавлены нулевым калибратором и повторно проанализированы. Концентрация образцов получается умножением результата на фактор разбавления. Каждый компонент одного анализа должен быть того самого лота и хранится при идентичных условиях.

Неиспользованные микропланшетные стрипы необходимо поместить в пластиковый пакет, что поставляется с набором с эксклюзивным осушителем. Не храните неиспользованные стрипы во вскрытом алюминиевом пакете, поскольку это может нарушить специфичность ячеек, при хранении длительное время охлажденным (высокая влажность).

Интерпретация

- При компьютерной обработке данных для интерпретации результатов, важно, что бы вычисленные значения калибраторов не падали ниже 10% указанной концентрации.
- В общем, концентрация тиротропина зависит от множества факторов: функционирования тиреоидной железы и ее регуляция. Поэтому, концентрация тиротропина сама по себе не достаточна для характеристики клинического статуса.
- Значения тиротропина в сыворотке может колебаться под фармакологическим влиянием. Домперидон, амиодазон, йодид, фенобарбитал и фенитоин, как указано, повышает уровень TSH. Уменьшение значений тиротропина вызывает влияние пропранолола, метимазола, допамина и d-тироксина.
- Генетическая вариация или деградация интактного TSH может влиять на характеристики антител и влиять на конечный результат. Такие образцы обычно показывают разные результаты через реактивность включенных антител.

Не для исследования новорожденных.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Было проведено изучение эутироидной взрослой популяции для определения ожидаемых значений этого теста. Результаты наведены в табл. Использовался непараметрическим методом (95% процентность оценки).

	Взрослые (110 образцов)
число	139
Низкая нормальная граница	0.39
Высокая нормальная граница	6.16
70% доверительные интервалы для 2,5 процентности	
Низкая граница	0,29-0,54
Высокая граница	5,70-6,92

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.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА**Точность**

Внутри и между тестовая точность была определена при анализе двух разных уровней контрольных сывороток сыворотки. Полученные данные показаны в табл.

Внутри тестовая точность

Образец	Число	Среднее	СО	КВ, %
1	24	2,32	0,07	2,98
2	24	5,00	0,11	2,27
3	24	14,55	0,34	2,34

Между тестовая точность

Образец	Число	Среднее	СО	КВ, %
1	10	2,13	0,11	8,1
2	10	13,93	0,45	4,1

Все измерения проводились в 10 экспериментах в дубликаты на протяжении 7 дней.

Точность

Данный набор был сравнен с тестом, при использовании радиоиммунного метода. Были использованы образцы гипотиреоидной, эутироидной и гипертироидной популяции (значения в границах 0,01-41 мЕ/л). Общее число образцов 165. Список уравнения квадратной регрессии и коэффициент корреляции были компьютеризированы и сравнены с установленным методом.

Метод	Среднее (x)	Анализ квадратной регрессии	Коэффициент корреляции
Данный метод	4,55	$Y=0.47+0.968(x)$	0,995
Установлены	4,22		

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

Чувствительность

Чувствительность (лимит определения) была получена исходя из вариабильности сыворотки и используя 0 мЕ/л калибратора и используя 2СО (95%) для вычисления минимальной дозы. Для 90 минутной инкубации = 0,027 мЕ/л

3, Специфичность

Перекрестная реактивность тиротропина IEMA к выбранным веществам был оценен добавлением влияющих веществ к сыворотковому матриксу при разных концентрациях. Перекрестная реактивность была вычислена делением коэффициента между дозой влияющих веществ к дозе тиротропина, необходимых для выработки той же абсорбции.

Вещество	Перекрестная реактивность	Концентрация
Тиротропин (hTSH)	1.0000	-
FSH	<0.0001	1000 нг/мл
LH	<0.0001	1000 нг/мл
hCG	<0.0001	1000 нг/мл

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Черногола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 77 51 22
Тел/факс: (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.com