



Набор ИФА для определения ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА (TSH)

Кат. № : E-TSH-1P
Количество : 96
Производитель: Dima Diagnostika (Германия)

Методика от 11-2005

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Для количественного определения концентрации тиреотропного гормона (ТТГ) в человеческой сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ

Определение сывороточных или плазменных уровней тиреотропного гормона (ТТГ) признано как чувствительный метод в диагностике первичного и вторичного гипотиреоза. ТТГ выделяется передней долей гипофиза и стимулирует производство и выпуск тироксина и трийодтиронина щитовидной железы. Это - гликопротеид с молекулярной массой приблизительно 28,000 дальтон, состоит из двух химически различных подгрупп альфа и бета. Хотя концентрация ТТГ в крови чрезвычайно низка, это достаточно для обслуживания нормальной функции щитовидной железы. Выпуск ТТГ регулируется ТТГ-Рилизинг Гормоном (ТРГ), производственным гипоталамусом. Уровни ТТГ и ТРГ обратно пропорционально связаны с уровнем гормонов щитовидной железы. Когда имеется высокий уровень гормонов щитовидной железы в крови, меньшее количество ТРГ выпускается гипоталамусом, так что меньшее количество ТТГ выделяется гипофизом. Противоположное действие произойдет, когда имеется уменьшение гормонов щитовидной железы в крови. Этот процесс известен как механизм отрицательной обратной связи и ответствен за поддержание надлежащих уровней этих гормонов в крови. ТТГ и гликопротеиды гипофиза: лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулстимулирующий гормон (ФСГ), и человеческий хорионический гонадотропин (ХГ), имеют идентичные альфа-цепи. Бета-цепь отлична, но содержит идентичные последовательности аминокислоты, которые могут причинять значительную взаимную реактивность с некоторым многоклеточным ТТГ-антисыворотками. Используемое моноклональное антитело в этом ТТГ наборе предотвращает эту реактивность, которая могла приводить к ложно завышенным значениям ТТГ в менопаузе или у беременных женщин – для которых оценка статуса щитовидной железы клинически важна.

ПРИНЦИП

Иммуноферментометрический анализ

Существенные реагенты, требуемые проведения для иммуноферментометрического анализа включают антитела высокой родственности и специфичности (ферментные и иммобилизованные), с различным и четким определением антигенной детерминанты в избытке, и натального антигена. В этой процедуре, иммобилизация имеет место в течение анализа на поверхности лунки микропланшета через взаимодействие покрытого на микропланшете анти-ТТГ и экзогенно добавленного моноклонального анти-ТТГ антитела.

При смешивании реакция проходит между фиксированным моноклональным антителом, ферментно-меченным вторым антителом и сывороткой, содержащей нативный антиген. Реакция, проходящая между нативным антигеном и антителами без соревнования или стерической помехи ведет к формированию sandwich комплекса.

После того, как достигнуто равновесие, фракция несвязанного антитела отделяется от несвязанного антигена путем фильтрации или аспирации. Деятельность фермента во фракции связанного антитела непосредственно пропорциональна нативной концентрации антигена. Используя несколько различных показателей сывороток с известными значениями антигена, можно вывести кривую ответной дозы, из которой возможно определение концентрации неизвестного антигена.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- A Стандарты Тиротропина: 0,4 мл/ea
- Шесть бутылочек для ТТГ антигена в количестве 0(A), 0.25(B), 0.75(C), 2(D), 5(E) и 15(F) мМЕ/л.
- B Контроль Тиротропина -0,4 мл/флакон, Концентрацию см. на этикетке!
- C Ферментный Конъюгат (готовый к использ.) 12 мл/флакон.
- D Микропланшетные лунки-96
- E Концентрат Промывочного Раствора - 25 мл (40 x).
- F ТМВ-субстрат 12 мл (готовый к использ.).
- G Стоп Раствор - 12 мл 1 бутылка, содержащая кислоту (0.25 моль/л H2SO4).

Примечание 1: Не используйте реагенты после истечения срока годности набора.

Для использования ТОЛЬКО в диагностике in vitro.

Не для внутреннего или внешнего использования людьми или животными.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Вся продукция, которая содержит человеческую сыворотку, отрицательная по отношению к гепатиту В поверхностному антигену, ВИЧ 1и2 и Антителам гепатита С согласно с FDA требуемыми анализами. Поскольку никакой из известных анализов не может предложить полную гарантию на то, что инфекционные носители отсутствуют, все продукты человеческой сыворотки нужно рассматривать как потенциально опасную и способную передавать болезни.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы должны быть из сыворотки крови, где нужно наблюдать обычные предосторожности при венопункции образцов. Для точного сравнения с установленными типичными значениям, нужно получить утренний образец натощак. Позвольте крови свернуться. Центрифугируйте образец, чтобы отделить сыворотку от клеток.

Образцы хранятся при 2-8°C в течение максимального периода до пяти (5) дней. Если образец(ы) не могут быть анализированы в пред этого времени, образец(ы) могут храниться при -20°C до 30 дней. Избегайте повторяющегося замораживания и размораживания. Когда анализировано в дуплете, требуется 0.100 мл образца.

Материалы, не входящие в состав поставки:

1. Точные пипетки: 25 ~ 100 мкл, с точностью более чем 1,5%.
2. Пипетка-дозатор для повторных внесений объемом 0.100 мл и 0.300 мл с точностью более чем 1.5% (необязательна).
3. Микропланшетный вошер или гибкая бутылка (необязательна).
4. Микропланшетный фотометр с 450 нм спектральной поглощательной способностью длины волны.
5. Диспенсер с регулируемым объемом (200-1000 мкл) для разбавления реагента.
6. Емкость(и) для смешивания реагентов (см. ниже).
7. Всасывающая бумага для протирания лунок микропланшета.
8. Пластмассовая обертка или крышка микропланшета для проведения инкубации.
9. Вакуумный аспиратор (необязательный) для промывки.
10. Таймер.
11. Емкость для хранения промывочного буфера.
12. Дистиллированная или деионизированная вода.
13. Материалы проверки качества

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ:

Промывочный буфер

Разбавьте содержимое промывочного концентрата с 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой в подходящем емкости для хранения. Храните при комнатной температуре.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед началом анализа приведите все реагенты, сыворотки и контроли к комнатной температуре (20 - 30°C).

1. Поместите нужное количество лунок для каждой сыворотки, контроля и образца пациента в дуплете в рамку для стрипов. **Удалите все неиспользуемые микролуночные полоски обратно в алюминиевую сумку, запечатайте и храните при 2-8°C.**
2. Внесите 0,025 мл (25 мкл) стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Инкубируйте при комнатной температуре в течении **10 мин.**
4. Внесите 100 мкл раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
5. Тщательно перемешайте содержимое лунок в течении 10 секунд. Важно добиться полного перемешивания.
6. Инкубируйте при комнатной температуре в течении **90 мин.**
7. Удалите содержимое лунок.
8. Промойте лунки дистиллированной или водой 5 раз.
9. Внесите 100 мкл ТМВ раствора в каждую лунку. **Всегда внесите реагенты в том же порядке, чтобы минимизировать разницу во времени реакции между лунками.**
10. Инкубируйте при комнатной температуре в течении **20 мин.**
11. Внесите 100 мкл стоп раствора в каждую лунку. **Всегда внесите реагенты в том же порядке, чтобы минимизировать разницу во времени реакции между лунками.**
12. Измерьте оптическую плотность лунок при 450 нм. **Результаты нужно считать в пределах пяти минут после добавления стоп раствора. Предпочтительно считывание следует провести немедленно после остановки реакции, поскольку ОП 450 может со временем слегка снизиться.**

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждой лаборатории следует установить свой контрольный диапазон показателей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

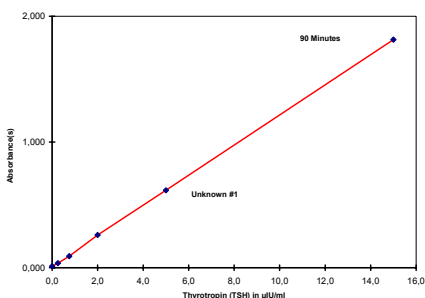
Кривая дозы используется для установления концентраций тиротропина в неизвестных образцах.

1. Определите абсорбцию из распечатки микропланшетного ридера как указано в Примере 1.

- Используя линейную или полулогарифмическую бумагу, отметьте точки значений поглощения стандартов в мМЕ/л на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации на горизонтальную ось X.
- Нарисуйте стандартную кривую по точкам графопостроителя.
- Чтобы определить неизвестную концентрацию ТТГ, разместите среднюю спектральную поглощательную способность дубликатов для каждого неизвестного показателя на вертикальной оси графика, найдите точку пересечения кривой, и считайте концентрацию (в мМЕ/л) из горизонтальной оси графика (дубликаты неизвестного показателя могут быть составлены в среднем, как указано). Средняя абсорбция (1.019) пересекает кривую (15.3 мМЕ/л концентрации ТТГ). (См. Рис. 1).

ПРИМЕР 1**ВРЕМЯ ИНКУБАЦИИ**

ЛУНКА	ОБЪЕМ СЫВОРОТОК	90 МИНУТ АБСОРБЦИЯ
1	0.0 мМЕ/л	0.014
2	0.0 мМЕ/л	0.011
3	0.25 мМЕ/л	0.031
4	0.25 мМЕ/л	0.037
5	0.75 мМЕ/л	0.091
6	0.75 мМЕ/л	0.077
9	2 мМЕ/л	0.271
10	2 мМЕ/л	0.259
13	5 мМЕ/л	0.598



14	5 мМЕ/л	0.633
15	15 мМЕ/л	1.853
16	15 мМЕ/л	1.776

Лушка	Неизвестно	ОП	Средн. ОП	Показатель
15	Неизвестно #1	0.412		
16	Неизвестно #1	0.424	0.418	3.6 мМЕ/л

Рисунок (1)

*Данные в Примере 1 на Рис. 1 используются только для иллюстрации и не должны использоваться вместо кривой ответной дозы для каждого анализа.

ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Максимальная абсорбция (15 мМЕ/л = 1,4 – 2,8).

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**А. Проведение анализа**

Важно, чтобы время реакции в каждой лунке было стабильным для результатов восстановления. Пипетирование образцов не должно длиться более десяти (10) минут. При использовании более чем одного (1) планшета, рекомендуется повторять кривую ответной дозы.

Образец(ы), которые являются биологически зараженными, не должны использоваться в анализе. Высоколипемические или гемолизированные образец(ы) так же не нужно использовать.

Добавление раствора субстрата провоцирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому, добавление субстрата и стоп раствора нужно добавлять в той же последовательности, чтобы исключить в любое время отклонение в течение реакции. Планшетные фотометры измеряют вертикально. Не касайтесь дна лунок.

Несоответствующее удаление раствора в этапах промывки или фильтрации может привести к недостаточной репликации и ошибочным результатам.

Образцы пациентов с концентрациями ТТГ выше 40 мМЕ/л могут разбавляться нулевым калибратором и повторно анализироваться. Концентрацию образца можно получить умножив результат на фактор разбавления. Каждый компонент в одном анализе должен соответствовать тому же номеру партии и храниться в аналогичных условиях.

Неиспользованные микропланшетные полоски нужно положить в пластиковую сумку со влагопоглотителем внутри алюминиевой сумки. Не храните неиспользованные полоски в открытой алюминиевой сумке. Поскольку это может уничтожить лунки, особенно, при длительном хранении в замороженном виде (высокая влажность).

В. Интерпретация

Концентрация тиротропина сыворотки зависит от множества факторов: функция железы гипоталамуса, функция щитовидной железы, реакция гипофиза на ТТГ. Поэтому, одной концентрации тиротропина недостаточно для оценки клинического состояния.

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

Было предпринято обследование эутиреоидного взрослого населения, чтобы определить ожидаемые значения для ТSH IEMA Микропланшетной Системы Анализа. Перечень определенных диапазонов предоставляется в Таблице 1. Использовался непараметрический метод (95% оценка).

ТАБЛИЦА 1**Ожидаемые значения для ТТГ IEMA Системы Анализа (в мМЕ/л)**

Количество	139
Нижний стандартный диапазон	0.39
Высший стандартный диапазон	6.16
70% интервалов для процентиля	2.5
Нижний диапазон	0.29 - 0.54
Высший диапазон	5.70 - 6.92

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**А. Точность**

Точность внутри и между анализами ТТГ IEMA Микропланшетной Системы Анализа была определена анализами на двух различных уровнях смешанных сывороток. Количество, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток представлено в Таблице 2 и Таблице 3.

ТАБЛИЦА 2

Образец	N	Точность в анализе (значения в мМЕ/мл)		
		X	CO	КВ
Объединение 1	24	2.32	0.07	2.98%
Объединение 2	24	5.00	0.11	2.27%
Объединение 3	24	14.55	0.34	2.34%

ТАБЛИЦА 3

Образец	N	Точность между анализами (значения в мМЕ/мл)		
		X	CO	КВ
Объединение 1	10	2.13	0.11	8.1%
Объединение 2	10	13.93	0.45	4.1%

*Измерено в 10 экспериментах в дуплете в течении 7 дней.

В. Точность

Диапазон значений составляет 0.01 мМЕ/л – 41 мМЕ/л). Полное число таких образцов составило 165. Наименьшее уравнение квадратической регрессии и коэффициент корреляции были определены для ТТГ IEMA в сравнении с контрольным методом. Полученные данные отображены в Таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Анализ наименьшей квадратической регрессии		Коэффициент корреляции
		у = 0.47 + 0.968 (x)	0.995	
Диапазон	4.55			
данного метода	4.22			

С. Чувствительность

Чувствительность (предел определения) был установлен путем определения 0 мМЕ/л калибратора сыворотки и используя 2σ (95% уверенность), статистически, чтобы вычислить минимальную дозу: Для 90 мин. инкубации = 0.027 мМЕ/л.

Д. Специфичность

Перекрестная реактивность тиротропина методом IEMA по отношению к отобраным веществам была определена добавлением реактивных веществ в матрицу сыворотки в различных концентрациях. Перекрестная реактивность была определена соотношением между дозой реактивного вещества и дозой тиротропина, необходимой для произведения аналогичной абсорбции.

Вещество	Перекрестная реактивность	Концентрация
Тиротропин (ТТГ)	1.0000	-
Фоллитропин (ФТП)	< 0.0001	1000 нг/мл
Лютеинизирующий гормон (ЛГ)	< 0.0001	1000 нг/мл
Хорионический гонадотропин (ХГТ)	< 0.0001	1000 нг/мл

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

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