

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ТСГ (ТИРЕОТРОПНИЙ СТИМУЛЮЮЧИЙ ГОРМОН) ELISA

TSH ELISA

Каталог. №: EIA-4171

Дата випуску інструкції: 09-2015
Версія 10.0



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

1. ВСТУП

1.1 ПРИЗНАЧЕННЯ

DRG ТСГ ELISA – це ферментний імуноаналіз для кількісного *in vitro* діагностичного вимірювання TSH у сироватці або гепариновій плазмі.

НЕ ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ ОБСТЕЖЕННЯ НОВОНАРОДЖЕНИХ.

1.2 Короткий опис та пояснення

Вимірювання сироваткової концентрації тиротропіну (ТТГ), глікопротеїну з молекулярною масою 28000 Дальтон і виділення з передньої долі гіпофіза, зазвичай розглядається як найбільш чутливий показник, доступний для діагностики первинного та вторинного (гіпофізного) гіпотиреозу (1, 2). Збільшення ТТГ у концентрації сироватки, яка в першу чергу відповідає за синтез і вивільнення тиреоїдних гормонів, є раннім і чутливим показником зниження резерву цитоподібної залози і в поєднанні з зниженою концентрацією тироксину (Т4) є діагностикою первинного гіпотиреозу. Очікуване збільшення у концентрації ТТГ, свідчить про класичну систему негативного зворотного зв'язку між гіпофізом і щитовидною залозою. Тобто, первинна недостатність щитовидної залози зменшує секрецію гормонів щитовидної залози, що, у свою чергу, стимулює вивільнення ТТГ з гіпофіза.

Крім того, вимірювання ТТГ однаково корисні для диференціації вторинного і третинного (гіпоталамічного) гіпотиреозу від первинного захворювання щитовидної залози. Вивільнення ТТГ з гіпофіза регулюється тиреотропним релізінг-фактором (ТРГ), який виділяється гіпоталамусом, і прямою дією Т4 і трийодтироніну (Т3), гормонів щитовидної залози, на гіпофіз. Збільшення рівнів Т3 і Т4 знижує відповідь гіпофіза на стимулюючі ефекти ТРГ. При вторинному і третинному гіпотиреозі концентрації Т4 зазвичай низькі, а рівень ТТГ зазвичай низький або нормальний. Це викликає дефіцит ТТГ гіпофіза (вторинний гіпотиреоз) або недостатність стимуляції гіпофіза ТРГ (третинний гіпотиреоз). Тест на стимуляцію ТРГ відрізняє ці умови. При вторинному гіпотиреозі відповідь ТТГ на ТРГ сповільнюється, тоді як у третинному гіпотиреозі, отримують нормальну або уповільнену відповідь.

Крім того, поява імуноферментних аналізів надала лабораторії достатню чутливість, щоб дозволити диференціювати гіпертиреоз від еутиреїдної популяції і розширювати корисність вимірювань ТТГ. Цей метод є аналізом другого покоління, який забезпечує засоби для дискримінації в гіпертиреїдно-еутиреїдному діапазоні.

2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір DRG ТСГ ELISA – це твердофазний ферментно-зв'язаний імуносорбентний аналіз (ELISA), який базується на принципі «сандвіча». Мікротитрові лунки покриті моноклональним (мишачим) антитілом, спрямованим до унікального сайту молекули ТТГ. Аліквота зразка пацієнта, що містить ендогенний ТТГ, інкубується у покритій лунці з ферментним кон'югатом, який є антитілом до ТТГ кон'югованим з пероксидазою хрому. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається. Кількість пов'язаної пероксидази пропорційна концентрації ТТГ у зразку. Додавши розчин субстрату, інтенсивність утвореного кольору пропорційна концентрації ТТГ у зразку пацієнта.

3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Для діагностики *in vitro*. Тільки для професійного використання.
- Всі реагенти цього набору містять людську сироватку або плазму, яка була протестована та підтверджена, що є негативною на ВІЛ I/II, HBsAg та HCV схваленими методами FDA. Всі реагенти, хоча, слід вважати потенційно біологічно небезпечними у використанні та утилізації.
- Перед початком аналізу, прочитайте інструкції повністю та уважно. Використовуйте дійсну версію інструкцій з використання, які постачаються з набором. Переконайтесь, що все зрозуміло.

- Мікропланшет містить відрізи смужки. Невикористані лунки потрібно зберігати при температурі від 2°C до 8°C у герметично закритій упаковці, та використовувати у наданій рамці.
- Піпетування зразків та реагентів потрібно здійснювати якомога швидше і в тій же послідовності для кожного етапу.
- Використовуйте резервуари тільки для одних реагентів. це особливо стосується резервуарів із субстратом. Використовуючи резервуар для розчину субстрату, в якому до того зберігався розчин кон'югату, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакони, тому що це може спричинити забруднення.
- Ретельно перемішайте вміст лунок, щоб отримати добрі результати. Не використовуйте мікролунки повторно.
- Не дозволяйте лункам пересихати під час аналізу; додайте реагенти негайно після завершення етапу промивання.
- Дозвольте реагентам досягнути кімнатної температури (21°C до 26°C) перед початком тестування. Температура буде впливати на зчитування абсорбції аналізу. Хоча, на значення зразків пацієнтів не будуть впливати.
- Не піпетуйте ротом і уникайте контакту шкіри та слизових з реагентами.
- Не паліть, не пийте, не їжте і не застосовуйте косметику в місця роботи з реагентами.
- Використовуйте одноразові рукавички при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може впливати на результати.
- Поводьтеся з реагентами відповідно до правил безпеки.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
- Необхідно дотримуватися всіх обсягів, описаних в інструкції. Оптиміальні тестові результати отримують при використанні каліброваних піпеток.
- Не змішуйте компоненти різних наборів. Не рекомендується міняти місцями лунки різних планшетів навіть від одного набору. Набори можуть транспортуватися різними способами, тому допускається незначна різниця.
- Уникайте контакту зі *Стоп розчином*, який містить 0.5 M H₂SO₄. Він може спричинити подразнення шкіри та опіки.
- Деякі реагенти можуть містити Proclin, BND і/або MIT в якості консерванту. У випадку попадання в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
- ТМБ субстрат має подразнюючу дію на шкіру та слизову. У випадку можливого контакту, промийте очі великою кількістю води, а шкіру – водою з милом. Промийте забруднені об'єкти перед повторним використанням. При ковтанні, виведіть людину на свіже повітря.
- Хімікати і приготвлені або використані реагенти необхідно обробляти відповідно до вимог безпеки.
- Лист даних безпеки доступний за запитом безпосередньо від DRG.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, що постачаються:

1. **Мікропланшет**, 12 x 8 смужок, 96 лунок.
Лунки покриті моноклональним антитілом до анти-ТТГ.
2. **Стандарт (0-5)**: 6 флаконів, 0,4 мл, готові до використання;
Концентрації: 0-0.25-0.75-2.0-5.0-15 мМО/л.
Стандарти калібровані відповідно до Міжнародного Стандарту 81/565; Містять консерванти.
3. **Контролі Низький і Високий**, 2 флакони, 0,4 мл кожен, готові до використання. Обсяги та діапазони вказані на етикетці. Містять консерванти.
4. **Ферментний кон'югат**, 1 флакон, 12 мл, готовий до використання. Антитіло до анти-ТТГ, кон'юговане з пероксидазою хрому. Містить консерванти.
5. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 12 мл, готовий до використання, ТМБ.
6. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0,5 M H₂SO₄. Уникайте контакту зі стоп-розчином, він може викликати подразнення шкіри і опіки.
7. **Промивний розчин**, 1 флакон, 25 мл (40X), див. "Приготування реагентів".

Примітка: Додатковий 0 стандарт для розведення зразків надається за запитом.

4.2 Необхідні матеріали, які не постачаються

- Калібрований мікропланшетний зчитувач (450± 10 нм)(напр. DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Калібровані змінні точні мікропіпетки.
- Абсорбуючий папір.
- Дистильована вода або деіонізована вода.
- Таймер.
- Напівлогарифмічний папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

Якщо зберігати при 2-8 °С, неушкоджені реагенти зберігатимуть свою активність до закінчення терміну придатності. Не використовуйте реагенти після терміну придатності.

Всі розкриті реагенти повинні зберігатися при 2-8 °С. Мікропланшет необхідно зберігати при 2-8 °С. Як тільки пакет з фольги був відкритий, слід бути уважним, щоб його знову щільно закрити. Закриті набори зберігають активність протягом 2 місяців при дотриманні вищевказаних умов зберігання.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням приведіть всі реагенти і необхідну кількість смужок, що будуть використовуватися, до кімнатної температури.

Розчин для промивання

Додати деіонізованої води до 40X концентрованого розчину для промивання. Розбавити 25 мл концентрованого розчину для промивання 975 мл деіонізованої води до кінцевого об'єму 1000 мл. *Розведений розчин для промивання стабільний 2 тижні при кімнатній температурі.*

4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору необхідно проводити відповідно до вимог з безпеки. Спеціальна інформація для даного продукту вказана в листі даних з безпеки.

4.6 Пошкодження набору

При пошкодженні набору або компонентів необхідно повідомити виробника протягом 1 тижня після отримання набору. Пошкоджені компоненти не повинні використовуватися в аналізі. Їх необхідно зберігати до отримання заміни, після чого утилізувати.

5. ЗБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Для аналізу повинна використовуватися сироватка або гепарінова плазма.

Для порівняння з встановленими нормальними значеннями необхідно використовувати зразки сироватки, отримані вранці натщесерце.

Не використовуйте для аналізу гемолізовані, іктеричні і ліпемічні зразки. Не застосовувати зразки, що містять азид натрію.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Зберіть кров венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки), дайте можливість згорнутися і відокремте сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання. Для зразків крові, пацієнтів, які проходять антикоагулянтну терапію потрібно більше часу для згущення.

Плазма:

Провести забір цільної крові в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянт (напр. Sarstedt Monovette з відповідно підготовленою плазмою) і центрифугувати негайно після забору.

5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки повинні зберігатися закритими при температурі 2-8 °С до 5 днів. Для більш тривалого зберігання (до 30 днів) зразки повинні бути заморожені до -20 °С і зберігатися до проведення аналізу. Розморожені зразки переверніть кілька разів перед аналізом.

5.3 Розведення зразків

Зразки з початковими значеннями вищими, ніж найвищий стандарт, необхідно розбавити *0 стандартом* і повторно аналізувати як описано у Процедурі аналізу.

Для обчислення концентрації необхідно врахувати цей фактор розбавлення.

Наприклад:

- Розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл *0 стандарту* (ретельно перемішайте);
- Розведення 1:100: 10 мкл розведення «1:10» + 90 мкл *0 стандарту* (ретельно перемішайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Всі реагенти та зразки доведіть до кімнатної температури перед використанням. Всі реагенти перемішайте без утворення піни.
- Якщо ви вже розпочали тестування, то завершіть всі етапи без перерви.
- Використовуйте нові одноразові пластикові наконечники для піпеток для кожного стандарту, контролю або зразка. Щоб уникнути перехресного забруднення.
- Абсорбція – це функція часу інкубації та температури. До початку аналізу, рекомендується, щоб усі реагенти були готові, кришки зняті,

всі необхідні лунки закріплені у тримачі, та ін. це забезпечить рівний час для кожного етапу піпетування без перерви.

- Як правило, ферментна реакція лінійно пропорційна до часу та температури.

6.2 Процедура аналізу

У кожному аналізі слід використовувати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у тримачі рамки.
2. Внесіть по **25 мкл** кожного стандарту, контролю і зразка, використовуючи нові наконечники, у відповідні лунки.
3. Інкубуйте протягом **10 хвилин** при кімнатній температурі.
4. Додайте по **100 мкл ферментного кон'югату** в кожну лунку. Ретельно перемішайте протягом **10 секунд**. Дуже важливо досягти повного змішування на даному етапі.
5. Інкубуйте протягом **90 хвилин** при кімнатній температурі.
6. Різко витрусіть вміст лунок. Промийте розведеним мийним розчином **5 разів (300 мкл на лунку)**. Різко струсіть планшет над абсорбуючим папером і витріть залишки вологи.
Важливе зауваження: Чутливість і точність аналізу залежить від правильного виконання процедури промивання!
7. Додайте **100 мкл розчину субстрату** в кожну лунку.
8. Інкубуйте **20 хвилин** при кімнатній температурі.
9. Зупиніть ферментну реакцію додаванням **100 мкл стоп-розчину** в кожну лунку.
10. Виміряйте на мікротитровому планшет-зчитувачі оптичну щільність кожної лунки при **450 нм ± 10 нм** протягом **5 хвилин** після додавання *стоп-розчину*.

Бажано проводити зчитування результатів відразу ж після зупинки реакції, так як $ОШ_{450nm}$ може трохи збільшитися з плином часу.

6.3 Обчислення результатів

1. Обчисліть середню абсорбцію для кожного стандартів, контролів і зразків.
2. За допомогою напівлогарифмічного паперу, побудуйте стандартну криву відкладаючи середню абсорбцію отриману з кожного стандарту до його концентрації при значенні абсорбції на вертикальній осі (Y) і концентрації на горизонтальній осі (X).
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичний метод: результати у інструкціях з використання були обчислені автоматично використовуючи 4-Параметрову криву. (4 Parametr Rodbard 4 Parameter Marquardt є кращими методами.) Інші функції зменшення даних можуть дати дещо різні результати.
5. Концентрація зразків може зчитуватись зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище ніж концентрація найвищого стандарту необхідно розбавити або розглядати як > 15 мМО/л. При обчисленні концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

6.3.1 Типовий приклад стандартної кривої:

Наступні дані є лише демонстраційними і не можуть використовуватися замість даних, отриманих при аналізі.

Стандарт	Опт. одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0 мМО/л)	0.01
Стандарт 1 (0.25 мМО/л)	0.04
Стандарт 2 (0.75 мМО/л)	0.11
Стандарт 3 (2.0 мМО/л)	0.32
Стандарт 4 (5.0 мМО/л)	0.81
Стандарт 5 (15.0 мМО/л)	2.27

7. ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні та патологічні значення.

Німецькі директиви тиреоїдної діагностики рекомендують діапазон норми від 0.3 до 4.0 мМО/л.

Кореляційне дослідження між системними параметрами Abbott Architect TSH і тест системою TSH EIA-4171 з 70 зразками показує нормальний діапазон для тестової системи TSH EIA-4171 від 0.5 до 5.0 мМО/л (Abbott: 0.35 – 4.94 мМО/л)

Концентрація тиротропіну в сироватці залежить від множини факторів: функції гіпоталамуса, функції щитовидної залози та реагування гіпофіза на ТРГ. Таким чином, самої концентрації тиротропіну недостатньо для оцінки клінічного статусу.

Генетичні варіації або деградація інтактного ТТГ на субодиноці можуть впливати на характеристики очікування антитіл і впливати на кінцевий результат. Такі зразки зазвичай демонструють різні результати внаслідок реактивності залучених антитіл.

Самі результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Результати повинні корелювати з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Гарна лабораторна практика вимагає, щоб контролі запускали з калібрувальною кривою. Статистично значущу кількість контролів слід оцінювати для встановлення середніх значень і допустимих діапазонів для забезпечення належної продуктивності.

Рекомендується використовувати контролі відповідно до державних та місцевих правил. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі як нормального рівня, так і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, зазначені в даному сертифікаті, відповідають лоту набору і повинні використовуватися для порівняння результатів.

Також рекомендується використовувати національні та міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в встановлені межі матеріалів контролю, результати не є достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не виявлено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон справжнього аналізу знаходиться в межах 0.06-15 мМО/л.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Перехресна реактивність тиреотропіну в ІФА методі до обраних речовин була оцінена додаванням інтерферуючих речовин до сироваткової основи при різних концентраціях.

Перехресну реакцію не знайдено при тестуванні до:

100 000 мМО/мл	ХГЛ
100 мМО/мл	ФСГ
100 мМО/мл	ЛГ

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість була обчислена шляхом додавання 2 стандартних відхилень до середнього 20 повторів аналітів 0 стандарту і склала 0.06 мМО/л.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 Точність в аналізі

Варіабельність в аналізі вказана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє	КВ, %
1	18	0.95	3.88
2	18	3.26	3.16
3	18	8.79	3.36

9.4.2 Точність між аналізами

Варіабельність між аналізами вказана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє	КВ, %
1	4	1.18	9.17
2	4	3.29	5.33
3	4	9.05	3.32

9.5 Порівняння методів

Кореляція між системою параметрів тиреотропного гормону Abbott Architect і справжньою тест-системою:

		Abbott Architect (TSH)	
		Позитивний	Негативний
Набір TSH EIA-4171	Позитивний	17	0
	Негативний	7	46

Кількість: 70

Чутливість: 70.8%

Специфічність: 100%

Позитивний PDW: 100%

Негативний PDW: 86.8%

10. ОБМЕЖЕННЯ ПРИ ВИКОРИСТАННІ

Надійні і продуктивні результати будуть отримані при проведенні аналізу відповідно до інструкцій.

10.1 Інтерферуючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 30 мг/мл) не впливають на результати.

10.2 Інтерференція лікарських препаратів

Значення сироваткового тиреотропіну можуть бути завищеними через прийом лікарських препаратів. Домперідон, аміодазон, йодид, фенобарбітал і фенітоїн впливають на підвищення рівнів ТТГ. На зниження рівнів ТТГ впливають пропранолол, метимазол, допамін і д-тироксин.(4)

10.3 Хук-Ефект високої дози

Хук-ефект високої дози не спостерігався у цьому тесті до 2000 мМО/л ТТГ.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Надійність результатів

Тест повинен проводитися в точній відповідності з інструкціями виробника. Більш того, користувач повинен строго дотримуватися правил НЛП (належної лабораторної практики). Це особливо важливо при використанні контрольних реагентів. Важливо завжди включати відповідну кількість контролів при тестуванні для підтвердження відповідності та точності тесту. Результати тесту дійсні тільки, якщо всі контролі знаходяться в зазначених діапазонах, і якщо всі інші параметри тесту також в зазначених діапазонах. У разі, коли Ви сумніваєтеся, зверніться до виробника.

11.2 Терапевтичні результати

Терапевтичні результати не повинні ґрунтуватися тільки на лабораторних даних, навіть якщо всі результати тесту відповідають значенням, зазначеним у п.11.1. Будь-який лабораторний результат є тільки частиною клінічної картини.

Діагностика інфекційного захворювання не повинна ґрунтуватися на результатах тільки одного тесту. Точний діагноз повинен бути поставлений з урахуванням історії хвороби, симптоматики та серологічних даних.

Тільки результати тесту не можуть бути основою для терапевтичних висновків.

11.3 Відповідальність

Будь-яка модифікація тестового набору і/або заміна або зміна будь-яких компонентів тестового набору можуть негативно вплинути на результати тесту. Такі дії не дають права на заміну набору.

Будь-які претензії, пов'язані з невірною інтерпретацією лабораторних результатів, також недійсні. Виробник не несе відповідальності за пошкодження під час транспортування.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

