



Набор ИФА для определения в сыворотке человека ТИРЕОТРОПНОГО СТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА (ТСГ)

Кат. № : КТ3IW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 09-2007

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

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(См. на стр. 12 в оригинале инструкции).

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Это набор основан на методе иммуноферментометрического анализа (ИФМА). Используются двое различных моноклональных антител анти-ТСГ, одно нанесено на лунки и другое конъюгированное с биотином. В течение инкубации ТСГ, присутствующий в калибраторах и образцах, связывается сразу с обеими моноклональными антителами, формируя многослойный материал типа «сэндвич». В конце инкубации, свободный материал удаляется циклом аспирации/промывания. Затем во все лунки добавляется раствор стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (HRPO). Это приведет к взаимодействию с биотинилированными антителами, которые закреплены в твердой фазе. После дальнейшего цикла аспирации/промывки, остаточная ферментная активность, обнаруживаемая в лунках, будет таким образом прямо пропорциональной концентрации ТСГ в калибраторах и образцах и будет доступна для наблюдения при инкубации твердой фазы с раствором хромогена (тетраметилбензидином, ТМБ) в буфере субстрата. Колориметрическое считывание будет проводится с использованием спектрофотометра при длине волны 450 нм и 405 нм.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8⁰С
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8⁰С в течение 2 месяцев.

3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

- **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок, покрытых моноклональным антителом (мишиным) анти-ТСГ. Хранить неиспользуемые лунки в прилагаемом полиэтиленовом пакете тщательно закрытыми.
- **Калибраторы:** 1 флакон (2 мл) нулевого калибратора и 6 флаконов (1 мл) ТСГ в протеиновой основе следующих концентраций: 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15 и 50 мкМЕ/мл. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готовы к использованию.
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- **Ферментный конъюгат:** 2 флакона (15 мл) стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRPO), содержащего Tris-HCl, BSA и стабилизаторы. Консервант: неомицин. Готов к использованию.
- **Анти-ТСГ-биотин:** 1 флакон (13 мл) анти-ТСГ моноклонального IgG, конъюгированного биотином, в PBS и BSA. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готовый к использованию.
- **Контрольная сыворотка:** 1 флакон ТСГ в протеиновой основе. Консервант: неомицин. Растворить 1 мл H₂O. После растворения хранить при 2-8⁰С в течение 1 недели; при более длительном хранении заморозить при -20⁰С
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.

3.2 ОБЩИЕ РЕАГЕНТЫ для всех наборов гормонов Radim

- **Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween. Консервант: тимеросал (<0.05%). Разбавить содержимое флакона дистиллированной водой до 500 мл. В случае нерастворимых кристаллов растворите раствор, поместив флакон на несколько минут в температуру 37⁰С. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 30 дней при 2-8⁰С.
- **Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМБ с цитрат-фосфатным буфером и DMSO. Готовый к использованию.
- **Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Готовый к использованию.
Примечание: Чтобы получить раствор субстрата смешайте равные порции хромогена и субстратного буфера, используя чистый, тщательно очищенный флакон. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течении 1 часа после подготовки.
- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готовый к использованию.
 - Самоклеющаяся пленка для планшета.
 - Полиэтиленовый пакет.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Мерные колбы для разбавления реагентов.
- Микропланшетный шейкер, установленный на 1200 об/мин.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с интервалом 0-3,0 А при длине волны 450 и 405 нм.
- Миллиметровая графопостроительная бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

5. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфические реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащей загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре,это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Неполноценная промывка лунок может привести к неправильным

- классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
 - Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
 - Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
 - Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
 - Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат эти используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Храните образцы при 2-8°C в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы при -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Образцы с концентрациями ТСГ более чем 50мкМЕ/мл необходимо разбавить нулевым калибратором. Рекомендуется проводит разбавление в соотношении 1:5 (100 мкл образца + 400 мкл нулевого калибратора).

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА*

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
 - переворачивая образец, смешайте его перед использованием.
1. Приготовьте лунки для: бланка, калибраторов, контрольной сыворотки и образцов.
 2. Раскапать в соответствующие лунки по **100 мкл** каждого калибратора, контрольной сыворотки и образца.
 3. Раскапать по **100 мкл** анти-ТСГ-биотина во все лунки, кроме лунки бланка. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой и осторожно перемешайте.
 4. Инкубируйте лунки в течении **90 +/- 5 мин. при 37+/-2°C**.
 5. Удалите липкую пленку и осторожно проведите аспирацию инкубационной смеси во всех лунках.
 6. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
 7. Добавить по **100 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку кроме бланка. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой и осторожно перемешайте.
 8. Инкубируйте лунки в течении **90 +/- 5 мин. при 37+/-2°C**.

9. Удалите липкую пленку и осторожно проведите аспирацию инкубационной смеси во всех лунках.
10. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
11. Раскапать по **200 мкл** раствора хромоген-субстрата во все лунки.
12. Инкубируйте **15 мин. при 37+/-2°C**. Избегайте попадания прямого солнечного света.
13. Раскапать по **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
14. Считайте ОП желательно бихроматичным фотометром **при 450 нм** с референтной длиной волны 620 нм (обнулив аппарат лункой бланка) в течении **20 минут** после завершения анализа. В случае выхода абсорбции из диапазона считайте ее при 405 нм.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 23 в оригинале инструкции).

9. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения большей чувствительности существующий метод включает спектрофотометрическое считывание при двойной длине волны (450 и 405 нм). Для образцов с концентрациями ТСГ от 0 до 5 мкМЕ/мл считайте при длине волны 450 нм; для образцов с уровнем ТСГ более 5 мкМЕ/мл, считывайте при длине волны 405 нм. Нарисуйте калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибратора (ось x) напротив абсорбции для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации ТСГ в мкМЕ/мл получаются путем интерполяции абсорбций каждого образца на калибровочной кривой; в случае разбавленных образцов умножьте на фактор разбавления.

9.1 ПРИМЕР РАСЧЕТА

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные.

Калибратор/ образец (нг/мл)	Абсорбция при 450 нм	ТСГ	Абсорбция при 405 нм	ТСГ
Калибратор 0	0.017		0.006	
Калибратор 0.15	0.129		0.045	
Калибратор 0.5	0.371		0.132	
Калибратор 1.5	1.049		0.375	
Калибратор 5	2.632		0.940	
Калибратор 15	> 3.000		1.697	
Калибратор 50	> 3.000		2.241	
Образец 1	1.242	1.8 мкМЕ/мл	0.443	
Образец 2	> 3.000		1.875	19.5 мкМЕ/мл

9.2 Значения нормы

Указанные ниже значения считаются показательными. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный диапазон нормы.

Пациенты	Референтные значения
Эутиреоиды	0.5 - 4.0 мкМЕ/мл
Гипертиреоиды	< 0.4 мкМЕ/мл
Гипотиреоиды	> 5.0 мкМЕ/мл

9.3 Критерии достоверности

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что значение концентрации контрольной сыворотки указано в значении листа Контроля Качества.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Специфичность

Настоящий аналитический метод показал перекрестную реактивность равной 0,01% с ЛГ, ГР, ПРЛ, ХГЧ и ФСГ.

10.2 Чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе, значительно отличающейся от нулевого калибратора (средн. значение + 3 СО).

Эта доза составляет 0,015 мкМЕ/мл.

10.3 Точность

Была оценена при определении повторяемости и воспроизводимости анализа (вариабельности в анализе и между ними) на основании 3 сывороток при разных концентрациях ТСГ.

Повторяемость (в анализе)

Сыворотка	Средн. (мкМЕ/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во репликатов
A	0,79	0,04	5,62	20
B	8,46	0,23	2,80	20
C	24,26	0,59	2,44	20

Воспроизводимость (между анализами)

2 репликации каждой сыворотки анализируются в разных отдельных анализах.

Сыворотка	Средн. (мкМЕ/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во анализов
A	0,77	0,07	9,09	10
B	8,18	0,43	5,25	10
C	22,32	1,79	8,01	10

10.4 Достоверность

Проверена при проведении испытаний на восстановление и параллелизм:

Испытание на восстановление

Известные количества ТСГ были добавлены к объединению сывороток в норме и проанализированы.

Добавлено (мкМЕ/мл)	Ожидаемое значение (мкМЕ/мл)	Полученное значение (мкМЕ/мл)	Восстановление %
P1	---	1.74	----
P + 10	11.74	12.41	105.7
P + 5	6.74	6.85	101.6
P + 1	2.74	2.61	95.2
P + 0,5	2.24	2.22	99.1

Испытание на параллелизм

2 сыворотки с высокой концентрацией ТСГ были проверены нулевым калибратором при разных разбавлениях.

Разбавление	Ожидаемое значение (мкМЕ/мл)	Полученное значение (мкМЕ/мл)
S1 неразбавл.	---	4.1
1:2	2.0	2.0
1:4	1.02	0.96
1:8	0.51	0.45
1:16	0.25	0.23
1:32	0.12	0.10
S2 неразбавл.	---	20.49
1:2	10.24	10.47
1:4	5.12	5.22
1:8	2.56	2.40
1:16	1.28	1.25
1:32	0.64	0.66

10.5 «Хук-эффект»

Всякий раз, когда образцы с очень высокими концентрациями антигена анализируются неразбавленными в двухэтапном «сэндвич»-методе, как в этом наборе, "хук-эффект" может дать значения концентраций явно ниже чем фактические значения. Этот набор не дает "хук-эффекта" при концентрации до 2000 мкМЕ/мл.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты этого анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: (0342) 77 51 22;
тел./факс: (0342) 77 56 12
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua