

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТИРЕОТРОПІНУ В ЦІЛЬНІЙ КРОВІ ЛЮДИНИ

3124-15, Neo-Natal TSH ELISA

Каталог. №: 3124-15
Кількість : 96
Виробник : DAI, (США)

Методика від 10-15-2013
Версія В



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	2 x 96 тестів
Тест	Neo-Natal TSH ELISA
Метод	ІФА
Принцип	Конкурентний ІФА
Діапазон визначення	0-250 мкОд/мл
Зразок	50 мкл
Специфічність	97 %
Чутливість	1.0 мкОд/мл
Загальний час	~ 180 хвилин
Термін придатності	12-14 місяців від дати виробництва

* Лабораторні результати ніколи не можуть бути єдиною базою для медичного висновку. Історія хвороби пацієнта і подальші тести повинні бути прийнятні до уваги

ПРИЗНАЧЕННЯ

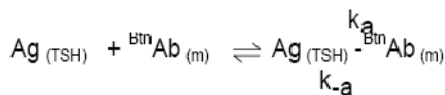
Кількісне визначення концентрації Тиреотропіну в цільній крові людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу.

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

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Послідовний імуноферментний аналіз (ТИП 4):

Необхідними реагентами для послідовного імуноферментного аналізу є антитіла високої спорідненості і специфічності (кон'юговані з ферментом і іммобілізовані), з різним і чітким розпізнаванням епітопу, в надлишку, і нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час тесту на поверхні лунки мікропланшета при взаємодії стрептавідину, нанесеного в лунки, і екзогенно доданого моноклонального анти-ТТГ антитіла. Після перемішування додається буфер для елюції з моноклональним антитілом, і висушені краплі крові, що містять нативний антиген; відбувається реакція між елююваним антигеном і антитілом з утворенням комплексу антиген-антитіло. Взаємодія описується таким рівнянням:



$BnAb(m)$ = Біотинильоване моноклональне антитіло (надмірна кількість)

$Ag (ТТГ)$ = Нативний антиген (змінна величина)

$Ag (ТТГ) - BnAb(m)$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна величина)

K_a = Постійна асоціації

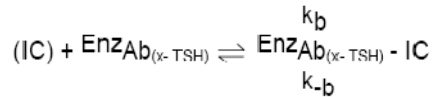
$K-a$ = Постійна дисоціації

$Ag (ТТГ) - BnAb(m) + Streptavidin_{CW} \Rightarrow$ іммобілізований комплекс (IC)

$Streptavidin_{CW}$ = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс (IC) = Ag-Ab, зв'язаний з лункою

Після відповідного інкубаційного періоду, пов'язана фракція антитіло-антиген відокремлюється декантуванням або аспірацією. Додається інше антитіло (спрямоване на інший епітоп), мічене ферментом. Інша взаємодія відбувається з утворенням ферментно-міченого комплексу антитіло-антиген-біотинильоване антитіло на поверхні лунки.



$EnzAb (X-ТТГ)$ = Мічене ферментом антитіло (надмірна кількість)

$EnzAb (X-ТТГ) - IC$ = Комплекс антиген-антитіло

K_b = Постійна асоціації

$K-b$ = Постійна дисоціації

Надлишок ферменту змивається під час промивки. Додається відповідний субстрат для отримання кольору, який вимірюється за допомогою мікропланшетного спектрофотометра. Активність ферменту в лунці прямо пропорційна концентрації ТТГ в краплі сухої крові. Використовуючи декілька різних крапель сухої крові з відомими концентраціями антигену, можна побудувати калібрувальну криву, з якої можуть бути отримані концентрації антигену в невідомому зразку.

РЕАГЕНТИ

Матеріали, які входять до складу набору:

A. Калібратори Неонатального ТТГ - краплі сухої крові (два ряди по шість крапель - 2 x 6)

Шість (6) рівнів антигену ТТГ в сухій крові в приблизних концентраціях 0(A), 7(B), 18(C), 45(D), 110(E) і 250(F) мкОд/мл на фільтрувальному папері S&S типу 903. Зберігати при температурі 2-8 °С. Консервант був доданий.

Примітка 1: Калібратори конкретної партії з цільною кров'ю людини в основі були відкалібровані з використанням еталонного препарату WHO 2nd IRP 80/558.

Примітка 2: Точні значення надруковані на зовнішній стороні алюмінієвого пакування.

B. Контролі Неонатального ТТГ - краплі сухої крові (два ряди по три краплі - 2 x 3)

Три рівні контролей цільної людської крові з різними концентраціями антигену ТТГ на фільтрувальному папері S&S типу 903. Зберігати при температурі 2-8 °С. Консервант був доданий.

Примітка 1: Контролі з цільною кров'ю людини в основі були виготовлені таким чином, щоб потрапити в значний клінічний діапазон з використанням тих же послань WHO як і для калібратора (див. вище).

Примітка 2: Точні значення надруковані на зовнішній стороні алюмінієвого пакування.

C. Ферментний реагент NTSH - 13 мл/флакон

Два (2) флакони, що містять мічені ферментами очищені поліклональні IgG кози x-ТТГ в буфері, і консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

D. Біотинильований реагент NTSH - 13 мл

Два (2) флакона Анти-ТТГ моноклональних IgG мічених біотином в буфері, зелений барвник і консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

E. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок

Два 96-лункових мікропланшета, покритих Стрептавідином, та упакованих в алюмінієвий пакет з осушувачем. Зберігати при температурі 2-8 °С.

F. Промивний розчин – 20 мл

Один (1) флакон, що містить сурфактант в буферному розчині. Консервант був доданий. Зберігати при температурі 2-30 °С.

G. Розчин Субстрату – 12 мл/флакон

Два (2) флакони, що містять Тетраметилбензидин (ТМБ) і перекис водню (H₂O₂) в буфері. Зберігати при температурі 2-8 °С.

H. Стоп-розчин – 8 мл/флакон

Два (2) флакони, що містять сильну кислоту (1N H₂SO₄). Зберігати при температурі 2-30 °С.

I. Вкладиш Інструкції

Примітка 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Примітка 2: Уникати тривалого впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні протягом 60 (шістдесят) днів при температурі 2-8 °С.

Примітка 3: Реагенти призначені для використання з 96 лунками.

Необхідні матеріали, що не входять до набору

- Лабораторний шейкер зі швидкістю обертання 150 об/хвилину.
- Диспенсер (и) для повторних внесень об'ємів 0.050 мл, 0.100 мл і 0.350 мл з точністю, більше ніж 1.5% (опційно).
- Мікропланшетний вошер або пластикова бутиль (опційно).
- Зчитувач мікропланшетів з довжиною хвилі 450 нм і 620 нм.
- 1/8" папір для нанесення крапель сухої крові.
- Абсорбуючий папір для декантування лунок мікропланшетів.

- Плівка або кришка для проведення інкубації.
- Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання.
- Таймер.
- Контейнер для зберігання Промивного Буферу.
- Дистильована або Деіонізована вода.
- Матеріали Контролю якості.

ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Збір проб у новонароджених здійснюється шляхом проколювання п'яток немовляти і нанесенням достатньої кількості цільної крові на паперову карточку S&S Фільтра (тип # 903), щоб заповнити зазначене коло. Дозволити фільтрувальному паперу висохнути при кімнатній температурі протягом ночі подалі від тепла та вологи. помістити зразок сухої крові (DBS) в поліетиленовий пакет з осушувачем і відправити в лабораторію.

Зразки повинні бути зібрані на протязі 3-7 днів після пологів; фізичні дані, включаючи вік і вагу дитини, будь-то багатоплідні пологи або передчасне народження і т.д. повинні супроводжувати зразок. Це важливо для лікаря, щоб знати ці факти для того, щоб правильно оцінити стан щитовидної залози у дитини. Висушені зразки крові стабільні при температурі 2-8 °C протягом 2-3 тижнів, якщо зберігаються в пакеті з осушувачем.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Для використання in-Vitro

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.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. 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 °C протягом 60 днів.

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 °C).

- 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 °C.
- Вибити 1/8 " кров'яні точки з кожного калібратора, контролю і зразків у відповідні лунки. (ПРИМІТКА: Не вибивати краплі крові з областей, які знаходяться біля надрукованого матеріалу, або які знаходяться поблизу краю плями крові).
- Додати 0.100 мл (100 мкл) Біотинильованого реагенту NTSH в кожну лунку.
- Обережно повертати планшет протягом 20-30 секунд для перемішування. і накрити плівкою. (Примітка: Переконайтеся, що всі краплі крові повністю занурені в рідину і не прилипли до стінок лунки).
- Накрити плівкою і інкубувати 90 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи лабораторний шейкер при 150 об/хвилину. (Примітка: дивись альтернативний метод інкубації протягом ночі).
- Видалити вміст мікропланшетів декантацією або аспірацією. У разі декантування промокнути планшет абсорбуючим папером. ПРИМІТКА: Переконайтеся, що всі краплі крові видаляються на цьому етапі. В лунках не повинно залишатися ніякої крові.
- Додати 350 мкл розчину для промивання (див. розділ про підготовку реагентів), декантувати або аспірувати. Повторити чотири (4) рази, щоб було в цілому п'ять (5) промивань. Автоматичне або ручне промивання можна використовувати. Виконувати інструкції виробника з експлуатації. Якщо використовується пластикова бутіль, наповнити кожну лунку стискуванням бутілі (уникаючи утворення повітряних бульбашок). Декантувати і повторити ще чотири (4) рази.
- Додати 0.100 мл (100 мкл) Ферментного реагенту NTSH в усі лунки.

- Накрити плівкою і інкубувати 45 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи лабораторний шейкер при 150 об/хвилину. (Примітка: дивись альтернативний метод інкубації протягом ночі).
- Повторити крок промивки №7.
- Додати 0.100 мл (100 мкл) розчину субстрату в кожну лунку.
- Накрити плівкою і інкубувати 45 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи лабораторний шейкер при 150 об/хвилину. (Примітка: дивись альтернативний метод інкубації протягом ночі).
- Додати 0.050 мл (50 мкл) стоп-розчину в кожну лунку і обережно перемішати протягом 15-20 секунд. Завжди додавати реагенти в такому ж порядку, щоб мінімізувати відмінності в часі реакції між лунками.
- Зчитати абсорбцію в кожній лунці при 450 нм (використовуючи контрольну довжину хвилі 620-630 нм, щоб мінімізувати недоліки). Вимірювання повинно проводитися протягом п'ятнадцяти (15) хвилин після зупинки реакції.

Альтернативна нічна процедура:

- Замінити інкубацією протягом ночі (12-16 годин) ротацію протягом 90 хвилин (крок 5). Ротатор не потрібен. Накрити пластину(и) поліетиленовою плівкою.
- Всі інші кроки залишаються тими ж.

ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

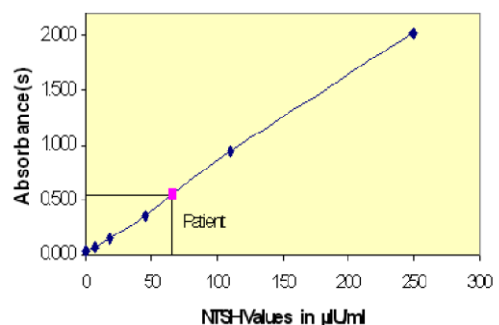
Крива використовується для визначення Тиреотропіну в невідомих зразках.

- Виміряти абсорбцію, отриману з роздруківки мікропланшетного рідера, як описано у прикладі 1.
- Позначте точками абсорбцію кожного дубліката стандартної сироватки проти відповідної концентрації ТТГ в мкОд/мл на міліметровому папері (не вираховувати середнє дублікатів стандартів сироватки перед побудовою).
- З'єднаємо точки в найбільш підходящу криву.
- Для визначення концентрації ТТГ в невідомих зразках, відзначте середню абсорбцію дублікатів кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайти точку перетину на кривій і прочитати концентрації ТТГ на горизонтальній осі графіка в мкОд/мл. У наступному прикладі, середня щільність (0.682) перетинає криву посилення на 51.1 мкОд/мл (див. Малюнок 1).

ПРИКЛАД

Взірець	№ лунки	Абс. (А)	Середнє Абс. (В)	мкОд/мл
Кал. А	A1	0.024	0.027	0
	B1	0.030		
Кал. В	C1	0.069	0.068	7
	D1	0.067		
Кал. С	E1	0.156	0.153	18
	F1	0.150		
Кал. D	G1	0.369	0.361	45
	H1	0.353		
Кал. E	A2	0.937	0.947	110
	B2	0.957		
Кал. F	C2	2.056	2.027	250
	D2	1.998		
Контр.1	E2	0.220	0.218	26.2
	F2	0.216		
Контр.2	G2	0.776	0.811	95.3
	H2	0.846		
Пацієнт	A3	0.533	0.543	66.3
	B3	0.533		

Малюнок 1



* Дані, представлені в Прикладі1 і Малюнку1, призначені тільки для ілюстрації і не повинні бути використані замість калібрувальної кривої, побудованої для кожного аналізу.

ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

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

1. Абсорбція (OD) калібратора F повинна бути ≥ 1.2 .
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні знаходитися у встановленому діапазоні.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контрольні в низькому, нормальному і високому діапазоні 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 деградації реагентів в наборі. Свіжі реагенти повинні бути використані, щоб визначити причину відхилення.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

А. 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 провокує 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 декантуванням може призвести до неточних результатів.
8. Використовуйте компоненти з тієї ж партії. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Точне піпетування, а також дотримання часових проміжків і температурних вимог є суттєвими. Будь-яке відхилення від вказаних інструкцій може привести до неточних результатів.
10. Всі діючі національні стандарти, правила і закони, в тому числі, але не обмежуючись, хороші лабораторні процедури, повинні строго дотримуватися для забезпечення дотримання та правильного використання пристрою.
11. Важливо калібрувати все обладнання, наприклад, Піпетки, читачі, вошери та/або автоматизовані інструменти, які використовуються, і виконувати рутинне профілактичне обслуговування.

В. Інтерпретація

1. Вимірювання та інтерпретація результатів повинна виконуватися кваліфікованим професіоналом.
2. 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.
3. Для коректних результатів випробувань, адекватні значення контролей та інші параметри повинні бути в межах зазначеного діапазону і вимог аналізу.
4. 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.
5. Якщо комп'ютерні програми використовуються для інтерпретації результатів тесту, потрібно, щоб прогнозовані значення калібраторів опинилися в межах 10% від відповідних концентрацій.
6. Концентрації ТТГ при циркуляції залежать від безлічі факторів: функції залози гіпоталамуса, функції щитовидної залози, і реакції гіпофіза ТРГ. Таким чином, концентрація Тиреотропіну сама по собі не є достатньою для оцінки клінічного стану пацієнта.
7. Значення ТТГ можуть бути збільшені при фармакологічному втручанні. Domperidone, amiodazon, йодид, фенобарбітал, фенітоїн збільшують рівні ТТГ.
8. Зниження значень Тиреотропіну відбувається при втручанні пропранололу, methimazol, допаміну і D-тироксину (4).
9. Генетичні зміни або деградації недоторканого ТТГ в субодиноці можуть вплинути на характеристики зв'язування антитіл і

впливають на кінцевий результат. Такі зразки зазвичай мають різні результати серед різних тест-систем у зв'язку з реактивністю антитіл.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рекомендовані принципи для скринінгу новонароджених на вроджений гіпотиреоз були опубліковані Американською Академією Педіатрії (AAP). Для дітей віком від 2 до 6 днів ці рекомендації класифікують ТТГ як "нормальний", "підвищений" або "злегка підвищений" щодо значень від 20 до 40 мОд/мл (тобто на мілілітр сироватки). У відповідності з керівними принципами AAP, " всі діти раннього віку з низьким T4 і ТТГ вище 40 мОд/л, як вважається, мають первинний гіпотиреоз, поки не доведено протилежне". Крім того, «у випадках, в яких концентрація скринінгового ТТГ лише злегка підвищена, вище 20 мОд/л, але менше 40 мОд/л, ще один зразок повинен бути отриманий для подальшого випробування".

Для того, щоб визначити придатність цих діапазонів для даного набору, обмежене вивчення 142 зразків нормальних новонароджених (3-7 днів) було проведено і спостерігався наступний діапазон:

Діапазон 0.7 мОд/мл - 34 мОд/мл

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можуть бути отримані з даним методом для "нормального" населення, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення, яке тестується, точність методу в руках аналітика. З цієї причини кожна лабораторія повинна використовувати діапазон очікуваних значень, встановлених заводом-виробником до тих пір, поки не буде визначений власний діапазон шляхом використання аналітики аналізів людей на території, де розташована лабораторія.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

А. Точність

Точність системи даного тесту в аналізі і між аналізами оцінювалася за допомогою аналізів на трьох різних рівнях насичених зразків цільної крові. 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 (мОд/мл)

Взірець	N	X	SD	CV, %
Пул 1	24	10.60	0.91	8.6
Пул 2	24	43.30	3.61	8.3
Пул 3	24	87.10	4.42	5.1

Таблиця 3
Точність між аналізами (мОД/мл)

Взірець	N	X	SD	CV, %
Низький	10	11.05	1.20	10.8
Нормальний	10	42.22	3.76	8.9
Високий	10	85.10	5.11	6.0

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

В. Точність

Дана тестова система порівнювалася з радіоімунним методом. Біологічні зразки від гіпотироїдних, еутироїдних і гіпертироїдних пацієнтів були використані (значення варіювали від 1.0 мОд/мл до 142 мОд/мл). Загальна кількість досліджених взірців 156. 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	17.83	$Y = -1.3223 + 0.975(X)$	0.979
Референтний	16.50		

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

С. Чутливість

Чутливість (межа виявлення) оцінюється визначенням мінливості сироваткового калібратора зі значенням 0 мОд/мл та використанням 2σ (95% точності) для розрахунку мінімальної дози. Мінімальна визначна доза складає 1.0 мОд/мл.

D. Специфічність

Перехресна реактивність даного методу на обрані речовини оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю насиченої крові в різних концентраціях. Перехресна реактивність розраховується шляхом отримання відношення між дозою речовини і дозою Тиреотропіну, необхідного для виробництва тої ж абсорбції.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
Тиреотропін (ЛТТГ)	1,0000	-
фолітропін (ЛФСГ)	< 0,0001	1000 нг/мл
Lutropin гормон (ЛЛГ)	< 0,0001	1000 нг/мл
Хоріонічний гонадотропін (ХГл)	<0,0001	1000 нг/мл



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
www.diameb.com