

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНУ НЕОНАТАЛЬНОГО МЕТОДОМ ІФА

Neonatal TSH (N-TSH) Test System

Кат. №: 3425-300A

Дата випуску інструкції: 04-30-2012
Версія: 5



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

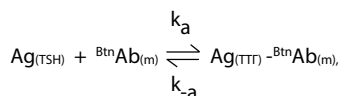
Тест призначений для кількісного визначення Тиреотропіну (неонатального) в цільній крові людини.

2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (тип 4):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані антитіла до ТТГ. При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген ТТГ, між ТТГ антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



${}^{Bn}Ab_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

Ag_{TSH} = Нативний антиген (змінна кількість)

$Ag_{(TSH)} - {}^{Bn}Ab_{(m)}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

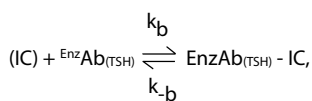
$Ag_{(TSH)} - {}^{Bn}Ab_{(m)} + \text{Стрептавідин}_{c.w.} \Rightarrow \text{іммобілізований комплекс (IC)}$,

$\text{Стрептавідин}_{c.w.}$ = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхню лунок.

Одночасно в осередках утворюється комплекс при реакції високоафінного стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від незв'язаних антигенів декантациєю або аспірацією. На наступному етапі додаються інші антитіла (специфічні до іншого епітопу), мічені ферментом. В осередках утворюється комплекс [антитіло-антиген-біотинильоване антитіло]. Надмірна кількість ферментного кон'югату видаляється промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл визначається в реакції з відповідною кількістю субстрату, вона прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.



$\text{Enz}Ab_{(TSH)}$ = фермент-мічені антитіла (надлишкова кількість);

$\text{Enz}Ab_{(TSH)} - IC$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_{-b} = константа швидкості дисоціації

4. РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Нео-ТТГ - точки з висушеної крові (2 ряди по 6 точок різних рівнів - 2 x 6)

Шість рівнів антигену ТТГ в точках висушеної крові з концентраціями 0 (A), 7 (B), 18 (C), 45 (D), 110 (E) і 250 (F) мкМО/мл ($\mu\text{IU/ml}$), поміщених на фільтрувальний папір S&S тип 903. Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.

Зауваження 1: Калібратори є *лот-специфічними*, на основі цільної крові людини, при калібруванні використаний стандарт, досліджений по 2-му Міжнародному стандарту ВООЗ для ТТГ IRP 80/558.

Зауваження 2: Точні значення надруковані на звороті алюмінієвого пакета.

B. Контролі Нео-ТТГ - точки висушеної крові (2 ряди по 3 точки - 2x3)

Три рівні контролю з цільної людської крові з різними концентраціями антигену ТТГ, поміщені на фільтрувальний папір S & S типу 903. Зберігати при 2-8 °C (°C). Містять консерванти.

Зауваження 1: Контролі на основі цільної крові людини були розроблені відповідно до клінічних діапазонів використовуючи референтні препарати як калібратори (див. вище).

Зауваження 2: Точні значення надруковані на звороті алюмінієвого пакета.

C. Ферментний реагент Нео-ТТГ - 13 мл (мл) у флаконі

Один флакон, що містить мічені ферментом афінно очищені поліклональні козячі x-ТТГ IgG в буфері і консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

D. Біотиновий реагент Нео-ТТГ - 13 мл (мл) у флаконі

Анти-ТТГ моноклональні IgG антитіла, біотинильовані, в буфері, зелений барвник і консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)

Один флакон, що містить ПАВ в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-30 °C (°C).

G. Розчин субстрату - 12 мл (мл) у флаконі

Один флакон, що містить ТМБ і перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл) у флаконі

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N H₂SO₄). Зберігати при 2-30 °C (°C).

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Лабораторний шейкер на 150 об/хв (rpm).
2. Диспенсери на 50, 100 і 350 мкл (μl) з точністю не гіршою 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском.
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. 1/8 "дирикол для паперу для вирізання кружків для точок з висушеної крові.
6. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
7. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
8. Вакуумний аспіратор (опційно) для кроків промивання.
9. Таймер.
10. Ємність для зберігання Промивного Буфера.
11. Дистильована або деіонізована вода.
12. Контрольні матеріали.

5. ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВРС і поверхневого антигену

гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 2nd Edition, 1988, HHS.

6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Для скринінгу гіпотиреозу збирають зразки крові новонароджених з п'яти. Необхідно зібрати об'єм, достатній для заповнення маркованого кружка на фільтрувальному папері марки S & S тип № 903. Отриманий зразок можна висушити через ніч при кімнатній температурі, уникаючи нагрівання і вологості. Транспортувати зразки можна у вологонепроникному пластиковому пакеті з осушувачем.

Збір крові проводять на 3-7 день після народження. До зразків повинна бути додана така інформація: дата народження, вага новонародженого; доношена/недоношена дитина, єдина дитина/дитина від багатоплідної вагітності. Ці факти важливі, щоб правильно оцінити тиреоїдний статус. Отримані зразки сухої крові можна зберігати при 2-8 °C (°C) протягом 2-3 тижнів у вологонепроникному пластиковому пакеті з осушувачем.

7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контрольні зразки з рівнями низьким, нормальним і високим для відстеження характеристик набору. Ці контрольні повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що постачаються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або розкладанні реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Розчин для промивання

Вилийте вміст концентрату розчину для промивання в посудину об'ємом 1000 мл (ml). Розбавте до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

Зауваження 1: Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.

9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контрольні повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контрольні для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Для кожного стандарту, контролю та зразка дироскопом виріжте диски діаметром 1/8 дюйма для точок крові на фільтрувальному папері з нанесеними стандартами, контрольними і зразками пацієнтів і перенесіть у відповідні лунки планшета. (Не вирізайте точки на папері за межами маркованої межі та біля краю кров'яної точки).
3. Додайте по 100 мкл (μl) Реагенту Нео-ТТГ Biotin в кожну лунку.
4. Акуратно потрусіть планшет (20-30 секунд). (Переконайтеся, що всі диски повністю занурені в рідину і не прилипають до стінок лунок.)
5. Закрийте планшет пластиковою кришкою. Інкубуйте 90 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °C (°C)) з струшуванням на шейкері зі швидкістю 150 об/хв (rpm). (Зауваження: або інкубуйте протягом ночі).
6. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація. **ЗАУВАЖЕННЯ:** Впевніться, що всі кров'яні точки видалені з лунок.
7. Додайте 350 мкл (μl) Промивного Буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще 4 рази (загальна кількість циклів промивки - 5). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний чи ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповніть кожну лунку до верху (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 4 рази.
8. Додайте по 100 мкл (μl) Ферментного Реагенту Нео-ТТГ в кожну лунку.
9. Накрийте його пластиковою плівкою і інкубуйте 45 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи лабораторний ротатор зі

швидкістю 150 об/хв (rpm). (Зауваження: дивись альтернативний метод інкубації протягом ночі).

10. Повторіть крок 7.
11. Додайте по 100 мкл (μl) Субстрату в кожну лунку.
12. Накрийте мікропланшет і інкубуйте 45 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи лабораторний ротатор зі швидкістю 150 об/хв (rpm). (Зауваження: дивись альтернативний метод інкубації протягом ночі).
13. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл (μl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
14. Виміряйте величини поглинання в кожній лунці на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

9.1 Альтернативний метод інкубації протягом ночі

1. Замініть інкубацію на протязі 90 хвилин на шейкері (крок 5) на інкубацію протягом ночі (12-16 годин). Шейкер не потрібен. Ретельно закрийте планшет пластиковою плівкою.
2. Всі інші кроки процедури залишаються без змін.

10. РЕЗУЛЬТАТИ

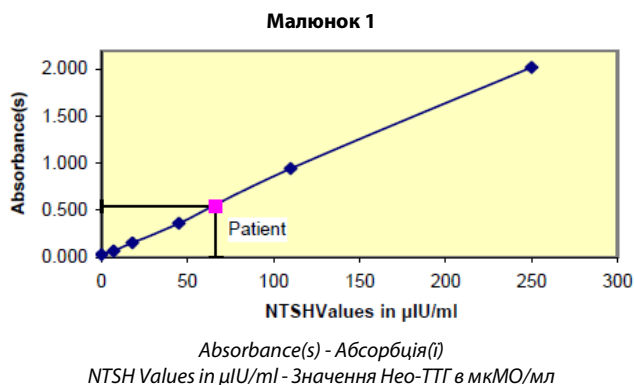
Для визначення концентрації Нео-ТТГ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх осередків як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації ТТГ в мкМО/мл (μU/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте невідомі концентрації ТТГ в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція (0.682) перетинає стандартну криву при 51.1 мкМО/мл (μU/ml) (див. мал.1).

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (мкМО/мл (μU/ml))
Калібратор А	A1	0.024	0.027	0
	B1	0.030		
Калібратор В	C1	0.069	0.068	7
	D1	0.067		
Калібратор С	E1	0.156	0.153	18
	F1	0.150		
Калібратор D	G1	0.369	0.361	45
	H1	0.353		
Калібратор E	A2	0.937	0.947	110
	B2	0.957		
Калібратор F	C2	2.056	2.027	250
	D2	1.998		
Контроль	E2	0.220	0.218	26.2
	F2	0.216		
Контроль	G2	0.776	0.811	95.3
	H2	0.846		
Пацієнт	A3	0.533	0.543	66.3
	B3	0.553		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.



11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора А має бути ≥ 1.2 .
2. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

12.1 . Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

1. *Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитися досвідченими професіоналами.*
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
4. **Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. Концентрація ТТГ в крові залежить від багатьох факторів: функції гіпоталамуса, щитовидної залози, відповіді гіпофіза на тиреоліберин. Таким чином, ТТГ окремо недостатньо для встановлення клінічного статусу.
7. ТТГ може підніматися під дією ліків: домперидон, аміодарон, йодид, фенофарбітал, фенітоїн.

8. Зниження рівнів ТТГ спостерігається при прийомі пропранололу, метімізолу, допаміну і d-тироксину.
9. Генетичні варіації або розпад інтактного ТТГ на субодиниці можуть впливати на здатність антитіл до зв'язування і, таким чином, на кінцевий результат. Такі зразки зазвичай надають різні результати в різних наборах за різної реактивності залучених антитіл.

13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Керівництво по скринінгу новонароджених на гіпотиреоз було опубліковано Американською Академією Педіатрів (ААП). Для новонароджених від 2 до 6 днів, ці рекомендації визначають концентрації ТТГ як «нормальні», «підвищені» і «тільки злегка підвищені» щодо діапазону 20 і 40 мкМО/мл ($\mu\text{IU/ml}$) (на мл (ml) сироватки). Відповідно до рекомендацій ААП, «новонароджений з низьким Т4 і ТТГ вище 40 мО/л (mU/l) вважається з вродженим гіпотиреозом, поки не доведено протилежне». Більш того, при тільки злегка підвищеній концентрації ТТГ, тобто від 20 до 40 мО/л (mU/l), потрібно взяти для повторного дослідження інший зразок.

Грунтуючись на обмеженій кількості зразків (142 новонароджених з нормальними показниками, на 3-7 день), досліджених за допомогою даного методу виробником, для новонароджених встановлений діапазон нормальних значень 0.7-34 мкМО/мл ($\mu\text{IU/ml}$).

Важливо враховувати, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції «нормальних» людей з використанням даного методу залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору Нео-ТТГ всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (мкМО/мл ($\mu\text{IU/ml}$))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
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* (мкМО/мл ($\mu\text{IU/ml}$))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	10	11.05	1.20	10.8
Пул 2	10	42.22	3.76	8.9
Пул 3	10	85.10	5.11	6.0

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублікатах протягом семи днів.

14.2 Чутливість

Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового Калібратора (мкМО/мл ($\mu\text{IU/ml}$)) плюс 2σ (стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі для підрахунку мінімальної дози. Чутливість аналізу склала 1.0 мкМО/мл ($\mu\text{IU/ml}$).

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним радіоімунним методом. Використовувалися зразки від пацієнтів з гіпо-, еу- і гіпертиреозом (діапазон значень від 1.0 до 142 мкМО/мл ($\mu\text{IU/ml}$)). Загальне число зразків було 156. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для Нео-ТТГ ІФА у порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	17.83	$y = -1.3223 + 0.975(x)$	0.979
Референсний	16.50		

Було знайдено тільки незначну розбіжність даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції методу з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин в сироватку в різних концентраціях. Перехресна реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою Тиреотропіну, необхідного для заміщення цієї кількості речовини.

Речовина	Перехресна реактивність	Концентрація
ТТГ людини	1.0000	-
Фоллітропін	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Лутропін Гормон	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)
Хоріонічний Гонадотропін	< 0.0001	1000 нг/мл (ng/ml)



ВИРОБНИК

MONOBIND INC.
100 North Pointe Dr.
Lake Forest, CA 92630 - USA
Phone: 949.951.2665
Fax: 949.951.3539
www.monobind.com

МОНОБАЙНД ІНК
100 Норд Поінт Драйв
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США
Тел.: 949.951.2665
Факс: 949.951.3539
www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

