

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНУ

### 6025-300, Rapid Thyroid Stimulating Hormone (Rapid TSH) Test System

Каталог. №: 6025-300

Методика від 15-04-2013

Кількість : 96

Версія 2

Виробник : Monobind Inc., (США)



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

#### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Кількісне визначення концентрації Тиреотропного Гормону або Тиреотропіну (ТТГ) в сироватці за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричний.

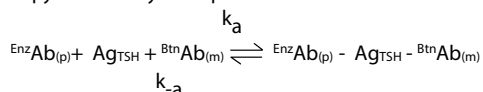
#### 2. ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

#### 3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

##### Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

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 моноклональні антитіла анти-ТТГ.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл, ферментного кон'югата і сироватки, що містить природний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція без конкуренції або просторових утруднень з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$\text{Ag}_{\text{TSH}}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAb}_{(p)}$  = ферментно-мічене полноклональне антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{TSH}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Комплекс антиген-антитіло

$k_a$  = Константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Константа швидкості дисоціації

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



Стрептавідин<sub>c.w.</sub> = Стрептавідин, нанесений в лунки

Імобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

#### 4. РЕАГЕНТИ

##### Матеріали, що постачаються:

**A. Калібратори Експрес TSH – 1 мл/флакон** 6 флаконів референтної сироватки для антигена TSH з концентраціями 0 (A), 0.5 (B), 2.5 (C), 10.0 (D), 30 (E) і 100 (F) мкМОд/мл. Зберігати при 2-8 °С. Містить консервант.

##### **B. Ферментний Реагент Експрес TSH – 13 мл/флакон**

Один (1) флакон, що містить фермент-мічене очищене полноклональне антитіло кози, біотинильоване моноклональне антитіло IgG миші в буфері, з барвником і консервантом. Зберігати при температурі 2-8 °С.

##### **C. Планшет, покритий Стрептавідином – 96 лунок**

Один 96-луночковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

##### **D. Концентрат розчину для промивання – 20 мл**

Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

##### **E. Субстрат А – 7 мл/флакон**

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

##### **F. Субстрат В – 7 мл/флакон**

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °С.

##### **G. Стоп-розчин – 8 мл/флакон**

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

##### **H. Інструкція**

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

**Зауваження 2:** уникати впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

#### 4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контейнер для зберігання промивного буфера.
10. Дистильована або деіонізована вода.
11. Контрольні матеріали.

#### 5. ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений 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, HCV 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, NHS.

**Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.**

#### 6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками мають бути кров, сироватка різних типів, дотримуватися звичайних застережних заходів при заборі зразків крові методом венепункциї. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірці з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °С до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °С на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл зразка.

#### 7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролю на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні

статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Промивний буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

### 2. Робочий Субстратний розчин – стабільний протягом одного року

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

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

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

## 9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

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

**\*\*Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованою людиною або навченим професіоналом\*\***

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.**
- Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) Ферментного реагенту TSH в кожен лунку. **Дуже важливо вносити всі реагенти близько до дна лунки.**
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування. Накрити пластиковою плівкою.
- Інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутылка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл 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.**
- Вимірюйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

**\*\* Для кращого низького рівня чутливості (< 0.5 мкМОд/мл) інкубувати 60 хвилин при кімнатній температурі. Калібратор 100 мкМОд/мл повинен бути виключений, тому що буде отримане поглинання більше 3.0 одиниць. Виконайте решту кроків.**

**Примітка 1: Розбавте зразки зі значеннями більше 100 мкМОд/мл 1:5 і 1:10 з '0' калібратором ТТГ. Помножьте результати на фактор розбавлення для отримання точних результатів.**

**Примітка 2: Якщо додаткові розбавлення необхідні, універсальний розчинник сироватки можна придбати, зателефонувавши представнику або безпосередньо Monobind.**

## 10. РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації TSH в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

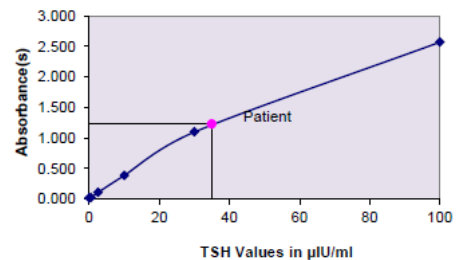
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації TSH в мкМОд/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації TSH в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.227 перетинає стандартну криву при 35.0 мкМОд/мл (див. мал.1)

Приклад 1

Взорець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація мкМОд/мл
Калібратор А	A1	0.007	0.019	0
	B1	0.009		
Калібратор В	C1	0.023	0.022	0.5
	D1	0.020		
Калібратор С	E1	0.104	0.108	2.5
	F1	0.112		
Калібратор D	G1	0.397	0.387	10
	H1	0.377		
Калібратор E	A2	1.101	1.098	30
	B2	1.095		
Калібратор F	C2	2.600	2.570	100
	D2	2.540		
Контроль	G2	0.026	0.027	0.524
	H2	0.028		
Пацієнт	A3	1.227	1.227	35.0
	B3	1.227		

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

Figure 1



## 11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

**Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:**

- Оптична щільність Калібратора F (100 мкМОд/мл) повинна бути  $\geq 2.0$ .
- Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

### 12.1. Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
- Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
- Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
- 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.
- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.

- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- 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.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- 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.
- Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

### 12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для процедур з використанням AccuBind® ELISA були розроблені для максимального усунення перешкод; однак, потенційна взаємодія між деякими зразками сироватки та реагентами можуть привести до помилкових результатів тесту. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних досліджень. Для діагностичних цілей, результати цього аналізу повинні бути використані в поєднанні з клінічним обстеженням пацієнта, історією і всіма іншими клінічними даними.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- 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.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Концентрація ТТГ в сироватці крові залежить від безлічі факторів: функції гіпоталамусу залози, функції щитовидної залози, і чутливість гіпофіза до TRH. Таким чином, визначення концентрації тиреотропіну не є достатнім для оцінки клінічного стану.
- Значення ТТГ можуть бути підвищеними фармакологічним втручанням. Домперидон, аміодарон, йодид, фенотропін, і фенітоїн, як повідомляється, збільшують рівень ТТГ.
- Зниження значень тиреотропного гормону відбувається при вживанні пропранололу, метімазолу, дофаміну і d-тироксину.
- Генетичні варіації або деградація інтактного ТТГ до підрозділів можуть вплинути на обов'язкові характеристики антитіл і впливати на кінцевий результат. Такі зразки зазвичай показують різні результати серед різних аналітичних систем у зв'язку з реактивністю антитіл, що беруть участь.

### "НЕ ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ ОБСТЕЖЕННЯ НОВОНАРОДЖЕНИХ"

### 13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Дослідження еутиреоїдного дорослого населення було проведено для визначення очікуваних значень для тестової системи AccuBind® ELISA Rapid ТТГ. Кількість і отриманий діапазон наведені в таблиці 1. Було використано непараметричний метод (95% процентиль).

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для Тест-системи AccuBind® ІФА Експрес ТТГ (в мкМОд/мл)

Number	139
Low Normal Range	0.39
High Normal Range	6.16
<b>70% Confidence Intervals for 2.5 Percentile</b>	
Low Range	0.28 – 0.53
High Range	5.60 – 6.82

Важливо мати на увазі, що створення очікуваного діапазону значень для нормального населення залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення і точності методу в руках оператора. З цих причин кожна лабораторія повинна орієнтуватись на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

### 14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

#### 14.1 Точність

Точність набору TSH всередині серії і між серіями визначалася в аналізі контрольних об'єднаних 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 (мкМОд/мл)

Взорець	N	x	σ	C.V., %
Пул 1	24	0.37	0.03	8.1
Пул 2	24	6.75	0.43	6.4
Пул 3	24	29.30	1.94	6.6

ТАБЛИЦЯ 3  
Точність між аналізами\* (мкМОд/мл)

Взорець	N	x	σ	C.V., %
Рівень 1	10	0.43	0.04	9.3
Рівень 2	10	6.80	0.54	7.9
Рівень 3	10	28.40	1.67	5.9

\*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях протягом семи днів.

#### 14.2 Чутливість

Чутливість (межа виявлення) оцінюється при визначенні варіабельності 0 мкМОд/мл калібратора сироватки і з використанням 2σ (95% точності) для розрахунку мінімальної дози.

При 30-хвилинній інкубації = 0.10 мкМОд/мл.

#### 14.3 Точність

Тест-систему ІФА TSH AccuBind® порівнювали з референтним методом. Були використані зразки від гіпотироїдної, еутиреоїдної і гіпертиреоїдної популяції (значення в діапазоні від 0.01 мкМОд/мл – 61 мкМОд/мл). Загальна кількість таких зразків становить 241. Отримані дані представлені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод	4.54	$Y = 0.47 + 0.968(X)$	0.995
Метод порівняння	4.21		

Тільки незначні розбіжності між даним аналізом і еталонним методом свідчать про близькість середніх значень. Рівняння регресії найменших квадратів і коефіцієнт кореляції показують відмінну узгодженість методів.

#### 14.4 Специфічність

Перехресна реактивність даного аналізу з вибраними речовинами оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в наступних концентраціях. Перехресна реактивність була обчислена шляхом отримання відношення між дозою додаткової речовини і дозою TSH, необхідного для отримання такої ж абсорбції.

Substance	Cross Reactivity	Concentration
Thyrotropin (hTSH)	1.0000	-
Follitropin (hFSH)	< 0.0001	1000ng/ml
Lutropin Hormone (hLH)	< 0.0001	1000ng/ml
Chorionic Gonadotropin(hCG)	< 0.0001	1000ng/ml



Monobind, Inc.  
100 North Pointe Drive  
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 [www.monobind.com](http://www.monobind.com)



**УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК**

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

