

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для количественного определения ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА (ТТГ) в сыворотке крови человека иммуноферментным методом (ИФА-ТТГ)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА-ТТГ предназначен для количественного определения тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Набор рассчитан на проведение анализа (в дубликатах) 40 исследуемых образцов, 7 калибровочных проб, контрольной сыворотки, всего 96 определений.

ТТГ – гликопротеин, продуцируемый передней долей гипофиза, секреция которого стимулируется тиролиберинем, синтезируемым клетками гипоталамуса. ТТГ действует, главным образом, на щитовидную железу, стимулируя синтез тироксина и трийодтиронина и выделение их в кровь. Под влиянием ТТГ тиреоглобулин переходит в фолликулярные клетки щитовидной железы, затем гидролизует протеолитическими ферментами с образованием Т4 и Т3. Выброс ТТГ регулируется циркулирующими в крови свободными фракциями гормонов щитовидной железы. Уровень ТТГ в крови снижается при высоких концентрациях свободных фракций гормонов щитовидной железы в периферической крови и, наоборот, повышается при низких концентрациях свободных фракций гормонов щитовидной железы.

Определение концентрации ТТГ в периферической крови важно для диагностики заболеваний щитовидной железы и гипоталамо-гипофизарной системы. Особое значение определение уровня ТТГ имеет при диагностике гипотиреоза, гипертиреоза и при терапевтическом мониторинге больных гипотиреозом, ежедневно получающих заместительную терапию тироксином.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на одностадийном варианте твердофазного иммуноферментного «сэндвич» анализа. Лунки планшета сорбированы стрептавидином. При одновременном внесении в лунку образца сыворотки, биотинилированных мышинных моноклональных антител против ТТГ и конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антител против ТТГ происходят следующие события: биотинилированные антитела через биотин связываются со стрептавидином на планшете и в то же время специфически взаимодействуют с ТТГ, присутствующим в сыворотке; далее с этим ТТГ через другой антигенный эпитоп связываются козы антитела, меченные пероксидазой. Несвязавшиеся реагенты удаляются в процессе отмывки, а образовавшийся иммунный комплекс выявляется ферментативной реакцией при добавлении субстрата. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию ТТГ в пробе.

СОСТАВ НАБОРА

- планшет 96-луночный с отламывающимися лунками, сорбированный стрептавидином - 1 шт.
- калибровочные пробы, содержащие известные количества ТТГ, готовые для использования*:

S0 (1 пробирка) 0,9 мл – 0 мМЕ/л	S4 (1 пробирка) 0,9 мл – 5,0 мМЕ/л
S1 (1 пробирка) 0,9 мл – 0,2 мМЕ/л	S5 (1 пробирка) 0,9 мл – 10,0 мМЕ/л
S2 (1 пробирка) 0,9 мл – 0,5 мМЕ/л	S6 (1 пробирка) 0,9 мл – 20,0 мМЕ/л
S3 (1 пробирка) 0,9 мл – 2,5 мМЕ/л	
- * (после первого открытия калибраторы стабильны в течение 6 месяцев хранения при +4 °С).
- контрольная сыворотка с известным содержанием ТТГ (концентрация указана на пробирке), готовая для использования - 1 пробирка (0,8 мл)
- конъюгат (состоит из козьих антител против ТТГ, меченных пероксидазой из корня хрена и биотинилированных мышинных моноклональных антител против ТТГ), готовый для использования - 1 флакон (13 мл)
- отмывочный раствор - фосфатно-солевой буфер 50 мМ рН7,4 с добавлением твин-20 1 г/л, 50-кратный концентрат - 1 флакон (10 мл)
- раствор хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), 11-кратный концентрат – 1 пробирка (1,5 мл)
- субстратный буфер, содержащий перекись водорода – 1 флакон (15 мл)
- стоп-реагент, содержащий 1 М серную кислоту, готовый для использования – 1 флакон (15 мл).

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

- планшетный фотометр с фильтром 450 нм
- термостат или планшетный шейкер-термостат, позволяющие поддерживать температуру 18-25 °С (в случае, если температура окружающего воздуха выходит за эти пределы)
- пипетки одноканальные на 50 - 100 мкл и на 200 – 1000 мкл
- пипетка многоканальная на 100-300 мкл
- таймер
- бумага фильтровальная
- перчатки резиновые
- мерный сосуд на 500 мл
- вода дистиллированная

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление рабочего отмывочного раствора: Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в сосуд с 500 мл дистиллированной воды. Перемешать. Рабочий отмывочный раствор стабилен в течение всего срока годности набора.

Приготовление рабочего раствора субстрата: Концентрат ТМБ развести субстратным буфером в 11 раз. (ВНИМАНИЕ: при разведении необходимо к субстратному буферу добавить ТМБ, а не наоборот). Готовится непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

Для анализа двух стрипов: 0,2 мл концентрата ТМБ смешать с 2 мл субстратного буфера.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для анализа используется сыворотка крови, также может быть использована плазма крови с ЭДТА. Плазма крови с гепарином может давать слегка завышенные результаты. Не рекомендуется использование гемолизированных или мутных образцов. Образцы до использования могут храниться не более 2 дней при 2 – 8° С. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить. Замороженные образцы после оттаивания хорошо перемешать. Исключить повторное замораживание и оттаивание.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Перед использованием тест-системы необходимо внимательно изучить данную инструкцию и строго соблюдать изложенные в ней требования. Производитель не несет ответственности за последствия, вызванные возможной некорректной работой тест-системы в случае несоблюдения требований инструкции.
2. Для каждого реагента и каждого этапа реакции должны быть использованы новые наконечники для пипеток.
3. Используйте только те количества реагентов, которые необходимы для данной постановки реакции. Оставшиеся неиспользованными растворы категорически запрещается переливать обратно во флаконы с исходными реагентами.
4. Субстратный буфер и ТМБ, а также рабочий раствор субстрата чувствительны к свету. Необходимо также исключить контакт этих растворов с окислителями, такими, как хлорсодержащие моющие средства и металлы.
5. Тестируемые образцы должны рассматриваться как потенциально инфекционный материал и при работе с ними и последующей утилизации необходимо руководствоваться утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.
6. ТМБ и рабочий раствор субстрата, а также стоп-реагент могут вызывать раздражение кожи и слизистых поверхностей при попадании на них. В этом случае необходимо обильно промыть водой место контакта и обратиться за медицинской помощью.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Выдержать набор при комнатной температуре (приблизительно 30 мин). Пакет с планшетом не открывать!
2. Встряхнуть все компоненты набора.
3. Извлечь планшет из пакета. Определить необходимое количество лунок (количество образцов + 8) x 2. Неиспользованные стрипы поместить обратно в пакет и плотно закрыть (пакетик с поглотителем влаги должен оставаться внутри).
4. Внести в соответствующие лунки (в дубликатах) по 50 мкл каждого калибратора, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

5. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата. Общее время внесения на весь планшет калибровочных проб, контрольной сыворотки, анализируемых образцов и раствора конъюгата не должно превышать 10 мин.
6. Заклеить планшет липкой лентой. Осторожно вращать планшет по поверхности стола в течение 10 – 15 сек для смешивания растворов.
7. Инкубировать 60 мин при комнатной температуре (18 – 25 °С).
8. Удалить жидкость из лунок и промыть 6 раз рабочим отмывочным раствором, внося в каждую лунку по 300 мкл. Удалить остатки раствора постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
9. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора субстрата.
10. Инкубировать в темном месте при комнатной температуре (18 – 25 °С) в течение 20 - 25 мин.
11. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента для остановки реакции (соблюдать ту же последовательность добавления стоп-реагента, что и при внесении раствора субстрата!). Осторожно вращать планшет по поверхности стола в течение 10 – 15 сек для смешивания растворов.
12. Провести измерение оптической плотности на фотометре с фильтром 450 нм не позднее, чем через 15 мин после остановки реакции (до измерения хранить планшет в защищенном от света месте).

ЗАМЕЧАНИЯ

1. В процессе постановки реакции необходимо предотвращать подсыхание лунок планшета и попадание на них яркого света и солнечных лучей.
2. Для получения качественных результатов необходимо аккуратное и полное удаление отмывочного раствора.
3. Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации, необходимо все реагенты, особенно стоп-реагент, вносить в лунки в той же последовательности с той же скоростью, что и предыдущие реагенты.
4. Не касаться дна лунок.

РАСЧЕТЫ

1. Рассчитать средние арифметические значения показателей оптической плотности калибраторов, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

2. Построить в линейных координатах калибровочную кривую зависимости оптической плотности (ось Y) от концентрации ТТГ в калибровочных пробах (ось X). Соединить полученные точки прямыми линиями.

3. При построении калибровочной кривой и определения концентрации ТТГ в исследуемых образцах с помощью автоматического анализатора рекомендуется использовать кусочно-линейный метод аппроксимации.

4. Для сывороток, содержащих ТТГ более 20 мМЕ/л, точное определение концентрации возможно после предварительного разведения калибровочной пробой S₀. Полученное значение концентрации умножается затем на коэффициент разведения.

5. Построение калибровочной кривой необходимо при каждой постановке реакции.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ПРЕДЕЛЫ

Ориентировочные значения уровня ТТГ в сыворотке в норме.

Возрастная группа	Единицы СИ
Взрослые	0,23 – 3,8 мЕд/л

Каждая лаборатория должна на контингенте своего региона определить свои референсные значения нормы ТТГ.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

1. Чувствительность набора составляет 0,078 мЕд/л – минимально определяемая концентрация ТТГ, рассчитанная на основании среднего арифметического значения 16 повторов калибровочной пробы S₀, содержащей 0 мЕд/л ТТГ, минус 2 SD (среднее квадратическое отклонение от среднего арифметического значения S₀) мЕд/л.
2. Воспроизводимость внутрисерийная установлена на основании исследования сывороток от 5 больных с различным содержанием ТТГ в крови и составляет <8%.
3. Воспроизводимость межсерийная установлена на основании исследования сывороток от 5 больных с различным содержанием ТТГ в крови и составляет < 10%.
4. Специфичность. Перекрестная реактивность при высоких уровнях лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), хорионического гонадотропина человека (ХГЧ).

Гормон		Концентрации
ТТГ	1.00000	-
ФСГ	<0,0001	1000 нг/мл
ХГЧ	<0,0001	1000 нг/мл
ЛГ	<0,0001	1000 нг/мл

5. Эффект высокой дозы (Hook effect).

Не наблюдалось эффекта высокой дозы при концентрации ТТГ 50000 мЕд/л.

Краткая схема проведения анализа

Необходимое количество лунок: (количество образцов + 8) x 2

Внести:

Стандарты S₀ – S₆, образцы, контрольная сыворотка	50 мкл
Конъюгат	100 мкл

Инкубация 1 час при комнатной температуре

Отмывка 6 раз (300 мкл./ лунка) отмывочным раствором

Внести 100 мкл рабочего раствора субстрата

Инкубация 20 - 25 мин при комнатной температуре в темноте

Внести 100 мкл стоп-реагента

Измерение ОП при длине волны 450 нм

ВНИМАНИЕ! Прежде, чем пользоваться данной схемой, внимательно ознакомьтесь с полной инструкцией к тест-системе