

# PATHOZYME® ULTRASENSITIVE TSH <sup>Ref</sup> OD447

## Immunoenzymatyczny test do ilościowego oznaczenia niskich poziomów TSH w ludzkiej surowicy.

### Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ.

### Do diagnostyki "in vitro".

#### WPROWADZENIE

Oznaczenie poziomu hormonu tyreotropowego (TSH) surowicy lub osocza jest uznawane jako czuła metoda w diagnostyce pierwotnej lub wtórnej niedoczynności tarczycy. TSH jest wydzielane przez przedni płat przysadki mózgowej i pobudza produkcję tyroksyny (T<sub>4</sub>) oraz trijodotyroniny (T<sub>3</sub>) gruczołu tarczycowego. Strukturalnie TSH jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 28.000 daltonów, składająca się z różnych chemicznie łańcuchów alfa i beta.

Mimo że, normalnie poziom TSH we krwi jest niezmiernie niski, to jest to niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania gruczołu tarczycowego. Sekrecja TSH jest regulowana przez hormon uwalniający tyreotropinę (TRH) produkowany przez podwzgórze. Poziom TSH i TRH ma odwrotne powiązanie do hormonów tarczycy. Wysoki poziom TSH we krwi powoduje spadek wydzielania TRH przez podwzgórze i w efekcie spadek sekrecji TSH przez przysadkę. Ten proces jest znany jako ujemne sprzężenie zwrotne i jest odpowiedzialny za utrzymanie prawidłowego poziomu TSH we krwi.

TSH i glikoproteiny przysadkowe: hormon luteotropowy (LH), hormon folikulotropowy (FSH) i ludzka chorionogadotropina (hCG), wszystkie mają identyczny łańcuch alfa. Natomiast w każdym z nich, łańcuch beta jest inny, chociaż sekwencja aminokwasów jest identyczna, co powoduje znaczną, krzyżową reaktywność z niektórymi poliklonalnymi surowicami anti-TSH.

Zastosowanie monoklonalnych przeciwciał w teście **PATHOZYME ULTRASENSITIVE TSH** eliminuje tę interferencję, która może powodować uzyskanie fałszywych wyników poziomu TSH, zarówno u kobiet w okresie menopauzalnym jak i u kobiet w ciąży, populacji dla których określenie poziomu hormonów tarczycy jest klinicznie znaczące.

Nie stwierdzono reakcji krzyżowych (wynik negatywny) dla następujących parametrów: HCG (WHO 1<sup>st</sup> IRP 75/537) dla poziomu 500,000 mIU/ml, FSH (WHO 2<sup>nd</sup> IRP HMG) dla poziomu 750 mIU/ml, LH (WHO 1<sup>st</sup> IRP 88/40) dla poziomu 750 mIU/ml, Prolactin (WHO 1<sup>st</sup> IRP 75/504) dla poziomu 100 ng/ml i HGH (WHO 1<sup>st</sup> IRP 65/217) dla poziomu 200ng/ml.

#### PRZEZNACZENIE

**PATHOZYME ULTRASENSITIVE TSH** jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczenia hormonu tyreotropowego (TSH) w ludzkiej surowicy. Do użytku w laboratorium.

#### ZASADA TESTU

Kubeczki mikroplastyki opłaszczane są specyficznymi, mysimi przeciwciałami anti-TSH. Do testu należy użyć surowicy. Następnie dodawane są kozie przeciwciała anti-TSH znakowane peroksydazą chrzanową (koniuugat enzymatyczny). Hormon TSH obecny w surowicy badanego pacjenta wiąże się z przeciwciałami opłaszczonymi na ściankach kubeczka. Dodany do kubeczka koniuugat enzymatyczny, również ulega przyłączeniu, tworząc tzw. kanapkę. Po inkubacji, nadmiar koniugatu zostaje odpłukany. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniuugat enzymatyczny, wskazujący na obecność TSH w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńczonego kwasu siarkowego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm. Test jest kalibrowany względem 2<sup>nd</sup> IRP NIBSC Hormonu Tyreotropowego 1983 80/558.

#### SKŁAD ZESTAWU

**Ref**  
**OD447**



Microtitre Plate		12 x 8 wells x 1
Dzielną mikroplastykę z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczoną w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.		
Cal	A	0 µU / ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona TSH. Liofilizat. (Bezbarwny)		
Cal	B	0,1 µU / ml
Standard referencyjny: TSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)		
Cal	C	0,5 µU / ml
Standard referencyjny: TSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)		
Cal	D	2 µU / ml
Standard referencyjny: TSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)		
Cal	E	5 µU / ml
Standard referencyjny: TSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)		
Cal	F	10 µU / ml
Standard referencyjny: TSH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)		
Washbuf	20X	
Koncentrat buforu myjącego: buforowany roztwór Tris zawierający detergenty. (Bezbarwny)		
Conj	11 ml	
TSH HRP koniuugat: koniuugat TSH znakowany peroksydazą chrzanową. Gotowy do użycia. (Różowy)		
Subs	TMB	
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzodyna w buforze cytrynianowym octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
Solin	Stop	HCl 1M
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w oczyszczonej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)		
<b>Instrukcja i druk protokołu.</b>		
1 + 1		

#### MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl, 1000µl i 5000µl.  
Końcówki do pipet.  
Papier absorbujący.  
Wytrząsarka do mikroplastyk, z prędkością mieszania 750 ± 25 RPM  
Czynnik mikroplastyk z filtrem 450 nm.  
Papier milimetry.  
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

#### ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw **PATHOZYME ULTRASENSITIVE TSH** zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV I i II – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw **PATHOZYME ULTRASENSITIVE TSH** nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw **PATHOZYME ULTRASENSITIVE TSH** zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu **PATHOZYME ULTRASENSITIVE TSH** zawierają 1% Proclin™ 300\* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

\*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

#### PRZECHOWYWANIE

Odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW (z wyjątkiem standardów) – zamrożenie powoduje nieodwracalne uszkodzenie.

#### PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Należy stosować świeżą surowicę.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydku sodowego jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

#### PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

Standardy: do każdej folii dodać po 1 ml wody destylowanej w celu rozpuszczenia liofilizatów. Odstawić na przynajmniej 20 minut przed użyciem. Rozpuszczone standardy są trwałe przez 30 dni jeśli są przechowywane w temp. 2°C - 8°C. W celu dłuższego przechowywania szczerlnie zamknięte standardy zamrozić w temp. - 20°C. Przed użyciem rozmrożone standardy muszą być delikatnie wymieszane.

Bufor myjący:  
Rozcieńczyć koncentrat buforu myjącego poprzez zmieszanie 1 części koncentratu z 19 częściami wody destylowanej. Na każde 8 kubeczków przygotować 25 ml rozcieńczonego buforu myjącego, tj. zmieszać 1,25 ml koncentratu buforu z 23,75 ml wody destylowanej. Do każdej serii badań przygotować świeży bufor myjący. Dodatkowa objętość buforu myjącego jest niezbędna do wstępnego przemycia automatycznej plucki.

Plukanie jest punktem krytycznym procedury wpływającym na wyniki. Niedokładne plukanie wpływa na uzyskanie wyników o niskiej precyzji i powoduje fałszywie zawyżone odczyty absorbancji.

## OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnoza nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

## PROCEDURA

1. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).  
Do każdej serii badań należy ustawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikropłytki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
2. Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
3. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 100µl standardów i próbek badanych.
4. Do każdego kubeczka dodać po 100µl koniugatu. Mieszać delikatnie przez 30 sekund. Bardzo ważne jest dokładne wymieszanie.
5. Inkubować 120 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C) mieszając na wytrząsarce przy prędkości 750 ± 25 RPM.
6. Ręczne płukanie: po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbcyjnym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkażający.
7. Napelnić kubeczki buforem myjącym, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl buforu. Wytrząsnąć zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbcyjnym. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie buforem.
8. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbcyjnym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
9. Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkażający. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie buforem myjącym. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbcyjnym lub papierowym ręczniku.
10. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
11. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
12. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100µl odczynnika zatrzymującego o reakcję.
13. Delikatnie mieszać i upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
14. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikropłytke przy długości fali 450 nm.

## WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być dozowane jednocześnie tak aby zachować jednakowe warunki przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikropłytki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pobierania odczynników z oryginalnych opakowań – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszczonych kubeczków mikropłytki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczaj roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdź precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odwarzalności wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć

## OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyc średnią wartość absorbancji ( $A_{500}$ ) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrowym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach µIU/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości TSH dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie. Jeżeli wyniki kalibracyjna lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny. Jeżeli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o krzywą regresji.

## WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny zależny proporcjonalnie od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji dla kalibratora A jest mniejsza niż 0,75, a wartość absorbancji dla kalibratora F jest większa niż 1,5.

W oparciu o określoną ilość próbek badanych pozyskanych od zdrowych, dorosłych ludzi, średnie stężenie TSH wynosi 1.6 (0.4-7.0) µIU/ml. Minimalne wykrywane testem **PATHOZYME ULTRASENSITIVE TSH** stężenie TSH wynosi 0.05µIU/ml.

Nie stwierdzono wpływu efektu Hooka na wynik oznaczenia wykonanego testem **PATHOZYME ULTRASENSITIVE TSH** do poziomu 100.0µIU/ml.

## OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów. Współczynnik zmienności dla testu **PATHOZYME ULTRASENSITIVE TSH** jest mniejszy lub równy 10%.

Do porównania testów Omega Pathozyne TSH i DPC Immulite 2000 TSH użyto próbek o wartościach TSH pomiędzy 0,4 do 63 µIU/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	62
Współczynnik korelacji	0.997
Wartość nachylenia krzywej	1.032
Punkt przecięcia z osią OY	0.240
Wartość średnia testem Omega	8.31 µIU/ml
Wartość średnia testem DPC	8.82 µIU/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

## PIŚMIENNICTWO

1. Soos, M., and Siddle, K. J. *Immunol. Methods* 1982;51:57-68.
2. Wada, H.G., Danisch, R.J., and Baxter.S.R. *Clin. Chem.* 1982;28:1862-1866.
3. Uotila, M., Rouslahti, E., and Engvall, E. *J. Immunol. Methods* 1981;42:11-15.
4. Burger, H.G., and Patel, Y.C. Thyrotropin releasing hormone-TSH. *Clinic. Endocrinol. Metab.* 1977;6:831.
5. Snyder, P.J., and Utiger, R.D. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1972;34:380-385.

## SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

1. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 100µl próbek badanych i standardów, a następnie do każdego kubeczka dodać po 100µl koniugatu enzymatycznego. Dokładnie mieszać przez 30 sekund.
2. Inkubować 120 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C) mieszając na wytrząsarce przy prędkości 750 ± 25 RPM.
3. Wylać zawartość z kubeczków i przepłukać 5-krotnie buforem myjącym.
4. Do każdego kubeczka dodać po 100µl substratu. Delikatnie mieszać przez 5 sekund.
5. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
6. Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
7. Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8094 ISSUE 9 Revised September 2014  
© Omega Diagnostics Ltd., 2014. **POLISH.**

