

For the Quantitative Measurement of Thyroid Stimulating Hormone (TSH) in Human Serum and Plasma

The concentration of Thyroid Stimulating Hormone (TSH) in a given specimen determined with assays from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity. The results reported by the laboratory to the physician must include the identity of the TSH assay method used. Values obtained with different assay methods should not be used interchangeably.

CAUTION: United States Federal law restricts this device to sale and distribution by or on the order of a physician, or to a clinical laboratory; and use is restricted to, by or on the order of a physician.

INTENDED USE

The FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay is a paramagnetic particle immunoassay for the *in-vitro* quantitative determination of TSH in human serum and plasma. The measurements of thyroid stimulating hormone (TSH) produced by the anterior pituitary are used in the diagnosis of thyroid or pituitary disorders. The FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay is designed for use with the FastPack® IP System and the FastPack® System.

SUMMARY

Thyroid hormones (T4 and T3) have many actions and are indispensable for growth, development, and sexual maturation. Actions include stimulation of heart rate and heart contraction, stimulation of protein synthesis and carbohydrate metabolism, increase in the synthesis and degradation of cholesterol and triglycerides, increase in vitamin requirements, and enhancement of sensitivity of β -adrenergic receptors to catecholamines^{1,2}. Therefore, thyroid dysfunction can have a profound global effect.

A tightly coordinated feedback relationship exists among the thyroid gland, hypothalamus, and pituitary gland³. The systems of these glands are closely interrelated and integrated, the result being maintenance of thyroid hormone levels in blood. Thyrotropin-releasing hormone (TRH), a tripeptide, is produced in the hypothalamus. TRH acts on the pituitary thyrotropes to cause synthesis and release of TSH⁷. TSH in turn controls the synthesis and release of thyroid hormones. A rise in thyroid hormone levels inhibits the pituitary response to TRH. A fall in thyroid hormone levels causes an increase in TRH and TSH secretion. A failure at any regulatory level of production of thyroid hormones (T4 and T3) will result in either underproduction (hypothyroidism) or overproduction (hyperthyroidism). With the advent of sensitive immunoassays, TSH has become one of the recommended analytes for evaluation of suspected thyroid dysfunction.

Human thyroid stimulating hormone (hTSH) or thyrotropin is a glycoprotein with a molecular weight of approximately 28,000 daltons, synthesized by the basophilic cells (thyrotropes) of the anterior pituitary^{2,8}. hTSH is composed of two non-covalently linked subunits designated alpha (α) and beta (β). The α -subunit of hTSH is common among several other hormones (follicle stimulating hormone, FSH; luteinizing hormone, LH; and human chorionic gonadotropin, hCG), however, the β -subunit is unique, and confers biological as well as immunological specificity. Both the α - and β - subunits are required for biological activity^{2,8}.

The FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay is based on the sandwich immunoassay principle: TSH in the sample (control or patient) is "sandwiched" between the two monoclonal antibodies during the first incubation. The TSH-antibody complex is then bound to the solid-phase paramagnetic particles. After washing the solid-phase to eliminate unbound reagents an alkaline phosphatase substrate is added. The amount of labeled anti-TSH antibody bound to the paramagnetic particles is directly proportional to the concentration of TSH in the sample.

TEST PRINCIPLE

The FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay is a chemiluminescence assay based on the "sandwich" principle.

- Primary incubation: Antibody solution (mixture of a biotinylated monoclonal TSH-specific antibody and a monoclonal TSH antibody labeled with alkaline phosphatase) [100 μ L] reacts with TSH from the patient's sample, control or calibrator [100 μ L].
- Secondary incubation: Streptavidin-coated paramagnetic particles are combined with the reaction mixture. During this incubation, the sandwich complex is bound to the solid-phase via the interaction of biotin and streptavidin.
- Removal of unbound materials: The paramagnetic particles are repeatedly washed with wash buffer [0.2 mL/wash] to remove unbound materials.
- Substrate addition and detection: Chemiluminogenic substrate [140 μ L] is added to the solid-phase bound complex and results in "glow" chemiluminescence, which is measured using the FastPack® IP System and FastPack® System.
- The amount of bound labeled-antibody is directly proportional to the concentration of TSH in the sample.

REAGENTS – Content and Concentration

Each FastPack® IP carton contains:

- 30 FastPack® IP

Each FastPack® carton contains:

- 50 FastPacks

Each FastPack® IP TSH or FastPack® TSH Contains:

- Paramagnetic Particles, 150 µL
Streptavidin-coated paramagnetic particles in buffer containing 0.1% sodium azide as a preservative.
- TSH Antibody Solution, 100 µL
Antibody solution containing a mixture of a biotinylated mouse monoclonal anti-TSH antibody and a second mouse monoclonal anti-TSH antibody labeled with alkaline phosphatase in a protein matrix containing Proclin® 150 as preservative.
- Wash Buffer, 2.0 mL
Tris buffer containing surfactants.
- Substrate, 140 µL
ImmuGlow™: Indoxyl-3-phosphate and lucigenin in buffer containing preservatives.

Materials required but not provided

- FastPack® IP System or FastPack® System
- FastPack® TSH Calibrator Kit – Cat. No. 25000024
- FastPack® TSH Control Kit – Cat. No. 25000025

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in-vitro* diagnostic use only.
- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink or smoke in designated work areas.
- Wash hands thoroughly after handling specimen.
- HAMA Interference: some individuals have antibodies to mouse protein (HAMA), which can cause interference in immunoassays that employ antibodies derived from mice⁶.
- FastPack® IP reagents and FastPack® reagents are stable until the expiration date on the label when stored and handled as directed. Do not use FastPack® IP reagents and FastPack® reagents beyond the expiration date.
- Discard used FastPacks into a Biohazard container.
- The components containing sodium azide are classified per applicable European Economic Community (EEC) Directives as: Very toxic and dangerous to the environment (T+ N). The following are appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases for sodium azide:

R28	Very toxic if swallowed.
R32	Contact with acids liberates very toxic gas.
R50/53	Very toxic to aquatic organisms. May cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
S28	After contact with skin, wash immediately with plenty of soap-suds.
S45	In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).
S60	This material and its container must be disposed of as hazardous waste.
S61	Avoid release to the environment. Refer to special instructions/safety data sheets.

STORAGE INSTRUCTIONS

Store at 2 – 8 °C.

SPECIMEN COLLECTION/PREPARATION

1. Serum and plasma samples can be used for the FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay.
2. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) provides the following recommendations for handling, processing and storing blood.^{4,5}
 - A. Collect all blood samples observing routine precautions for venipuncture.
 - B. For plasma samples:
 - Collect samples in a heparinized (green top) tube.
 - Mix the tube immediately after collection by gently inverting it several times.
 - Plasma should be separated from the cells by centrifugation within 3 hours from time of collection and stored at 2–8 °C. Transfer the plasma from the original tube for storage.
 - If not tested within 24 hours, the sample should be frozen at –20 °C or colder. TSH in plasma, as measured on the FastPack® IP System and Fastpack® System is stable for up to three freeze/thaw cycles.
 - C. For serum samples:
 - Collect samples in serum blood collection tubes.
 - Ensure that complete clot formation has occurred before centrifugation. Some specimens may exhibit increased clotting time, especially those from patients receiving anticoagulant or thrombolytic therapy.
 - Serum should be separated from the clot and centrifuged within 3 hours from time of collection.

- Remove serum from the cells prior to storage at 2–8 °C.
 - If not tested within 24 hours, the sample should be frozen at –20 °C or colder. TSH in serum, as measured on the FastPack® IP System and FastPack® System is stable for up to three freeze/thaw cycles.
- D. Do not freeze samples (–20 °C) for more than two months.
- E. Samples should be free of red blood cells, or other particulate material for optimal results.
- F. Samples showing turbidity and particulate matter should be centrifuged prior to use.
- G. Ensure the samples are free of bubbles.

ASSAY PROCEDURE

See the FastPack® IP System Procedure Manual for detailed instructions for running the FastPack® IP System and FastPack® System assays.

INSTRUMENTATION

FastPack® IP System or FastPack® System

DETAILS OF CALIBRATION

During the FastPack® IP and FastPack® production process, Qualigen generates a master standard curve and places this information in the barcode of each FastPack® IP and FastPack® label, where it can be read by the FastPack® IP System or FastPack® System analyzer during the testing sequence. The analyzer must be calibrated by the end user so that it is properly adjusted for the particular lot of FastPacks that are being used. Separate calibrations must be run for each type of test, i.e. Total PSA, Testosterone, or TSH. The frequency of calibration varies for each test type. For the FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay, the FastPack® IP System and FastPack® System analyzer must be calibrated once every 14 days or whenever a new lot of TSH FastPacks are to be used.

Whenever the user performs a calibration for a particular lot of FastPacks or uses a new lot of calibrator, 2 FastPacks must be run for calibration (duplicates). When the calibration expires (14 days after initial calibration) 2 FastPacks must be run for calibration. See the FastPack® IP System Procedure Manual for “Running a Calibration”.

Use FastPack® TSH Calibrator Kit – Cat. No. 25000024

RESULTS

The FastPack® IP System and FastPack® System analyzer uses the information from the barcode to construct a lookup table of x,y values that represent the standard curve and estimates the concentration of unknown samples by linear interpolation.

QUALITY CONTROL

Quality control materials simulate real specimens and are essential for monitoring the system performance of assays. Good Laboratory Practices (GLP) include the use of control specimens to ensure that all reagents and protocols are performing properly. See FastPack® IP System Procedure Manual for “Control Testing”. At least two levels of quality control materials should be used.

Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.

Controls available: FastPack® TSH Control Kit – Cat. No. 25000025

LIMITATION OF PROCEDURE

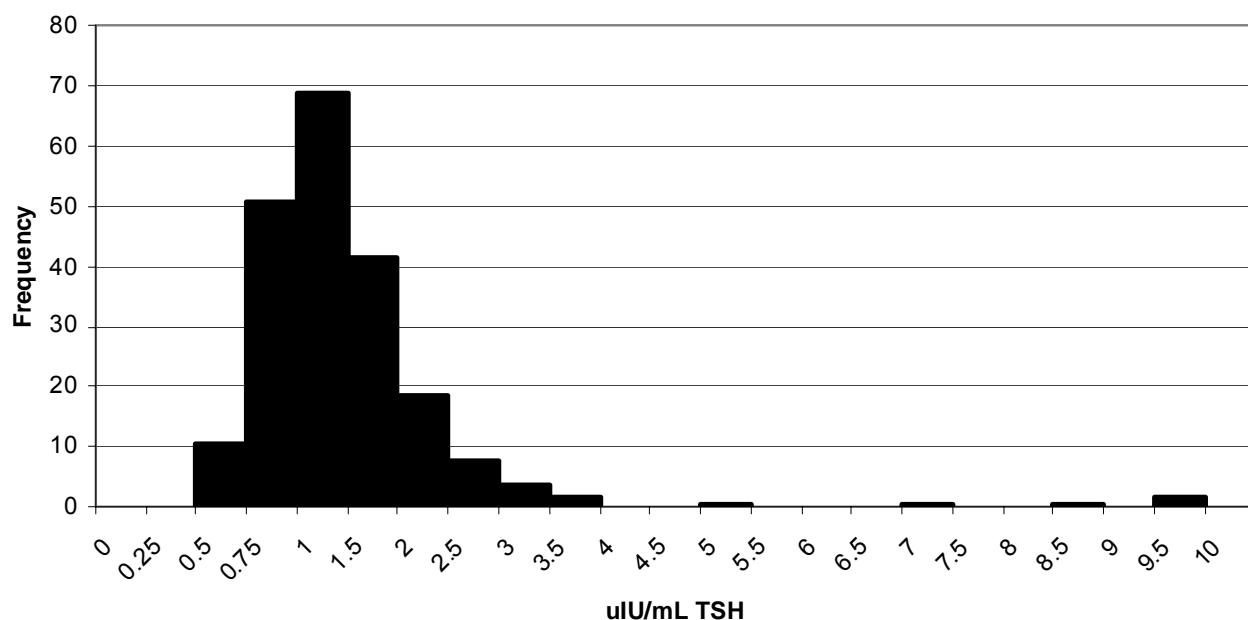
- Plasma samples to be collected using heparin as the anticoagulant.
- Specimens can be measured within the reportable range of 0.13 µIU/mL and the upper end of the calibration range, 100 µIU/mL.
- Samples >100 µIU/mL should be reported as such or re-run using another method. Samples may be diluted using the zero calibrator (Cal A) until within range of the assay.
- FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay does not show a high-dose hook effect up to 5,000 µIU/mL.
- Specimen from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits employing mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in a sample have the potential to cause interference in immunoassay systems. Infrequently, TSH levels may appear depressed due to heterophilic antibodies present in the patient's sample or to nonspecific protein binding. If the TSH level is inconsistent with clinical evidence, additional TSH testing is suggested to confirm the result.
- For diagnostic purposes, the FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

- The TSH assay has not been evaluated in Point of Care settings.
- Performance of this assay has not been established with neonatal specimens.

EXPECTED VALUES

Samples were obtained from 211 individuals. Samples were obtained from apparently healthy blood donors without any clinically abnormal indications. TSH levels were determined using the FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay in conjunction with the FastPack® IP System and FastPack® System in order to establish the TSH concentration in the normal population. The normal range (central 95 percentile) for the FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Immunoassay is 0.66 – 5.45 $\mu\text{IU/mL}$. The expected range reflects the donor population of this study group. Each laboratory should determine their own reference range appropriate for their population.

Frequency Distribution of TSH Values Based on Qualigen's FastPack® IP System (n = 211)



SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

The reproducibility of the TSH assay was measured by testing pooled plasma samples in duplicate for each sample over ten days using three analyzers and two lots of reagents. Precision is expressed as the Coefficient of Variation. The samples used to assess precision were spread out over the linear range of the assay.

Sample	Number of Samples (N)	Mean ($\mu\text{IU/mL}$)	Between Run CV%	Between Analyzer CV%	Between Reagent Lot CV%	TOTAL CV%
1	117	1.54	7.4	0.5	0.3	9.7
2	117	12.39	5.2	1.1	4.8	7.5
3	120	46.30	5.1	5.0	1.1	9.5

In addition to the above samples, control materials were tested using three analyzers and two lots of reagents. Precision is expressed as the Coefficient of Variation. The control samples used to assess precision bracket the expected values for apparently health individuals.

Sample	Number of Samples (N)	Mean ($\mu\text{IU/mL}$)	Between Run CV%	Between Analyzer CV%	Between Reagent Lot CV%	TOTAL CV%
1	48	0.54	13.8	13.3	4.0	20.0
2	48	4.69	6.0	5.8	4.8	7.0

Precision in serum samples was compared to that observed in plasma samples via analysis of matched samples spanning the range of the assay. Precision is expressed as the Coefficient of Variation. The study showed equivalent performance in serum and plasma samples.

Sample Concentration Range	Number of Samples (N)	Plasma CV	Serum CV
0.0 - 1.0 $\mu\text{IU/mL}$	40	6.1%	7.0%
1.0 - 40.0 $\mu\text{IU/mL}$	101	4.4%	4.4%
40.0 - 100.0 $\mu\text{IU/mL}$	32	5.4%	4.0%

RANGE OF LINEARITY

Serum

Range of linearity in serum was evaluated following the CLSI EP6-A guideline. For TSH in serum as tested by the FastPack[®] IP TSH and FastPack[®] TSH assay, the method has been demonstrated to be linear from 0.11 $\mu\text{IU/mL}$ (limit of detection) to 100 $\mu\text{IU/mL}$ within 5 $\mu\text{IU/mL}$ in this interval.

Plasma

Range of linearity in plasma was evaluated following the CLSI EP6-A guideline. For TSH in plasma as tested by the FastPack[®] IP TSH and FastPack[®] TSH assay, the method has been demonstrated to be linear from 0.08 $\mu\text{IU/mL}$ (limit of detection) to 100 $\mu\text{IU/mL}$ within 5 $\mu\text{IU/mL}$ in this interval.

METHOD COMPARISONS

FastPack[®] v. Abbott IMx Ultrasensitive hTSH II

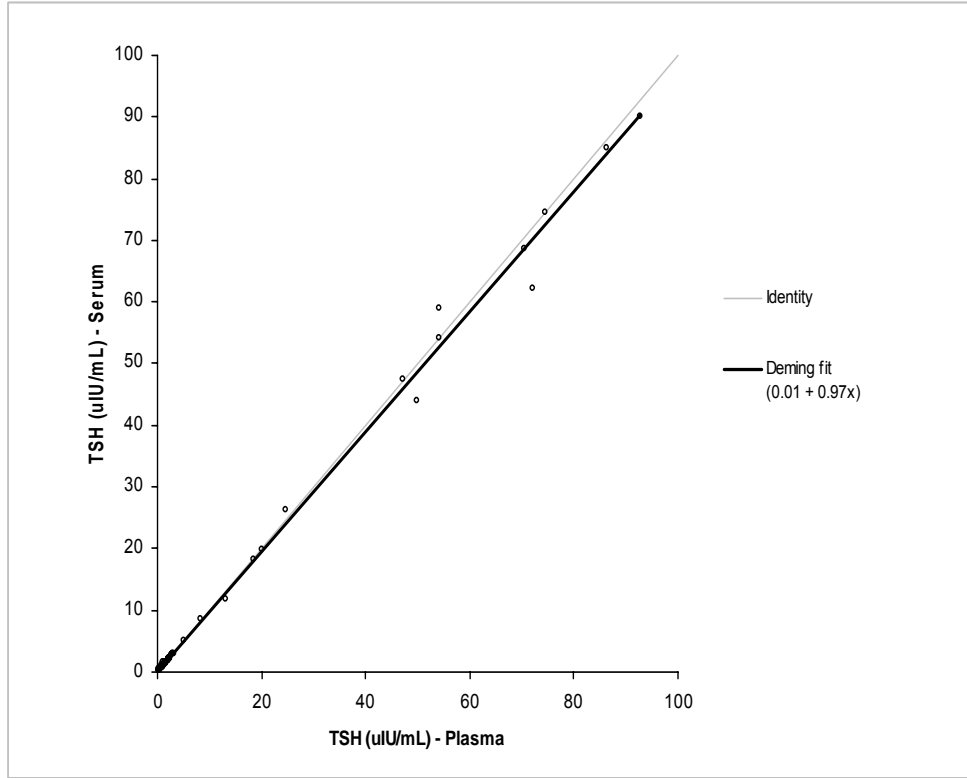
Clinical samples (n= 96 obtained as frozen plasma samples through outside laboratories) were used to compare the plasma values obtained using the FastPack[®] IP TSH and FastPack[®] TSH method and the plasma values obtained using the Abbott IMx Ultrasensitive hTSH II method. The values were evaluated for agreement using linear regression analysis, with the associated correlation coefficient.

n	Range of Observation ($\mu\text{IU/mL}$)	Intercept ($\mu\text{IU/mL}$)	Slope	R
96	0.03 to 87.99	0.83	1.03	0.97

FastPack[®] Serum v. FastPack[®] Plasma

Blood collections were obtained from 74 healthy male and female volunteers between the ages of 18 and 60, and these specimens were processed to heparin plasma and serum samples in parallel. The values were evaluated for agreement using Deming regression analysis, with the associated correlation coefficient.

n	Range of Observation ($\mu\text{IU/mL}$)	Intercept ($\mu\text{IU/mL}$)	Slope	R
74	0.22 – 92.75 (Heparin Plasma)			
74	0.24 – 90.00 (Serum)	0.01	0.97	1.00



INTERFERING SUBSTANCES

Interfering substances were added to three serum samples and one plasma sample containing known amounts of TSH. The value obtained for the serum or plasma sample with each interfering substance was compared to the value obtained for the serum or plasma without the interfering substance. An acceptance criterion of $\pm 20\%$ of the value for the serum or plasma sample without added interfering substance was pre-specified for the study. These compounds did not show interference at the levels indicated.

Serum Samples TSH Concentrations (uIU/mL)	Interfering Substance	Concentration, Interfering Substance	% Interference
1.0, 5.0, 20.0	Bilirubin	40 mg/dL	< 10
1.0, 5.0, 20.0	Hemoglobin	1,000 mg/dL	< 20
1.0, 5.0, 20.0	Triglycerides	1,000 mg/dL	< 5

Plasma Sample TSH Concentration (uIU/mL)	Interfering Substance	Concentration, Interfering Substance	% Interference
1.85	Bilirubin	40 mg/dL	< 5
1.63	Hemoglobin	1,000 mg/dL	< 5
1.63	Triglycerides	1,000 mg/dL	< 10

LIMIT OF BLANK (LOB), LIMIT OF DETECTION (LOD), AND LIMIT OF QUANTITATION (LOQ)

The limit of blank (LOB, the highest measurement likely to be observed for a blank sample), limit of detection (LOD, the lowest amount of analyte in a sample that can be detected with type I and II error rates set to 5%), and limit of quantitation (LOQ, the lowest amount of analyte in a sample that can be reliably detected and at which the total error meets the pre-specified requirement for accuracy) were determined for serum and plasma according to CLSI EP17-A. In this study, the Limits of Blank for serum and plasma samples were determined from 60 replicate determinations of defibrinated, delipidized, double charcoal filtered serum. Raw RLUs from the assays were converted to apparent uIU/mL based on the calibration curve for each assay. For each sample type, the LOB was determined as the non-parametric 95th percentile of the distribution of values. This value was 0.016 uIU/mL TSH for serum samples and 0.019 uIU/mL TSH for plasma samples.

For serum samples, the LOD was estimated from 60 replicate determinations of three low level serum samples. Based on the Gaussian distributions, LOD was determined by the following equation:

$$\text{LOD} = \text{LOB} + (c_{\beta} \times \text{SD}_S),$$

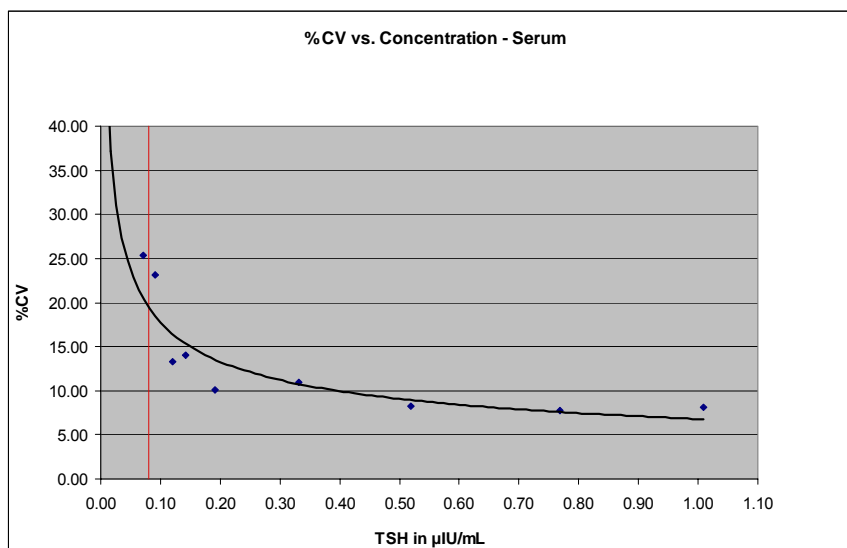
Where $c_{\beta} = 1.645/(1-(1/(4 \times f)))$, where f is the degrees of freedom, and SD_S is the standard deviation of the observations. In this study, the LOD was found to be 0.11 $\mu\text{IU/mL}$ TSH.

For plasma samples, the LOD was estimated from 60 replicate determinations of six low level plasma samples. Based on the non-Gaussian distributions, LOD was determined by identification of the lowest sample with values that displayed <5% overlap with blank values. This concentration was determined to be 0.08 $\mu\text{IU/mL}$ TSH.

For the LOQ determination in serum and plasma, the prospectively defined acceptance criteria for accuracy were 80-120% recovery of target value of low level samples and <20% CV. In this study, a serum sample with an assigned value of 0.127 $\mu\text{IU/mL}$ TSH met the acceptance criteria. For plasma, a sample with an assigned value of 0.129 $\mu\text{IU/mL}$ TSH met the acceptance criteria.

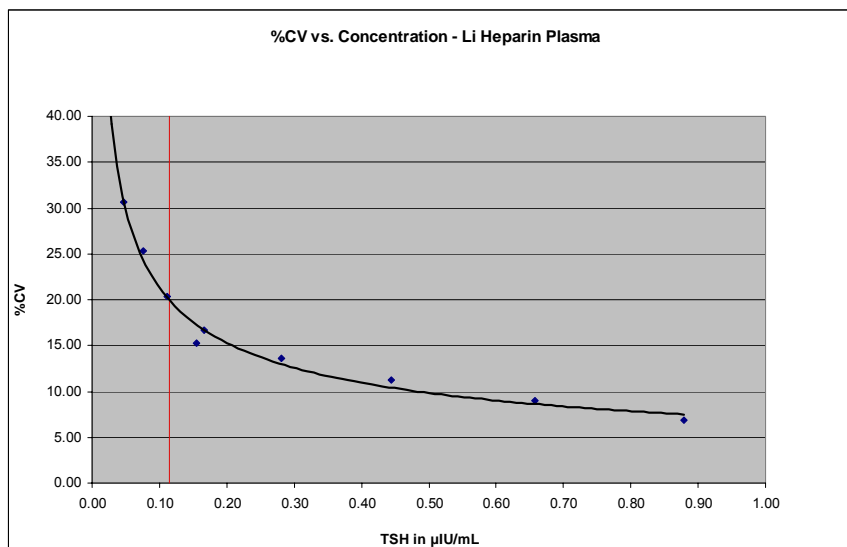
FUNCTIONAL SENSITIVITY IN SERUM AND HEPARIN PLASMA

Functional sensitivity, defined as the concentration in $\mu\text{IU/mL}$ TSH at which the assay displays a CV of 20%, was determined both for serum samples and lithium heparin plasma samples. For both methods, the investigation incorporated the preparation of 9 samples in the specified matrix, spanning a range of ~0.05 to 1 $\mu\text{IU/mL}$ TSH, followed by assay of each sample in 30 replicate determinations, (6 replicates/day over 5 days of testing) with one lot of FastPack[®] TSH reagents. Mean, standard deviation (SD), and % CVs were calculated from the replicate determinations. The mean TSH concentration for each sample was then plotted versus % CV and the data fitted via a power function of the form Ae^{kx} . The concentration at which 20% CV was achieved was then identified from the fitted data. The following chart displays the relationship between mean concentration and % CV. The vertical line in the plot identifies the point at which 20% CV occurs. For the FastPack[®] IP TSH and FastPack[®] TSH serum assay, this point occurs at 0.08 $\mu\text{IU/mL}$ TSH. Thus, the functional sensitivity of the FastPack[®] IP TSH and FastPack[®] TSH serum assay is estimated to be 0.08 $\mu\text{IU/mL}$ TSH.



TSH lithium heparin plasma functional sensitivity

The following chart displays the relationship between mean concentration and % CV. The vertical line in the plot identifies the point at which 20% CV occurs. For the FastPack® IP TSH and FastPack® TSH heparin plasma assay, this point occurs at 0.115 $\mu\text{IU/mL}$ TSH. Thus, the functional sensitivity of the FastPack® IP TSH and FastPack® TSH heparin plasma assay is estimated to be 0.115 $\mu\text{IU/mL}$ TSH.



SPECIFICITY

Serum

Three pools of serum samples were prepared to achieve concentrations of ~ 1 , 5, and 20 $\mu\text{IU/mL}$ TSH. Each sample was separated into four aliquots and three of these were spiked with hCG, LH, and FSH to concentrations of 200,000, 500 and 500 mIU/mL. Samples were tested along with the unspiked reference in five replicates each on two FastPack® instruments using one lot of test packs. Data were analyzed for % difference versus the reference containing no spiked antigens. An acceptance criterion of $\pm 20\%$ of the unspiked reference value was pre-specified for the study. In no case, do the spiked antigens alter the recovery by more than 20%.

Plasma

TSH-stripped plasma was spiked with different concentrations of hCG, FSH, and LH to determine if these materials gave a positive TSH signal in the assay. Cross-reactivity of the antibody used in the FastPack® IP TSH and FastPack® TSH assay was shown to be not detectable for hCG, LH, and FSH tested at 200,000, 500 and 500 mIU/mL, respectively.

REFERENCES

- ¹ Braverman, LE, Utigen, RD, Eds: Werner and Ingbar's The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text. 7th ed., Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996.
- ² Burtis, CA, Ashwood, ER, Eds: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed., New York, WB Saunders Company, p. 1492, 1999.
- ³ Larsen, PR: Thyroid-pituitary interaction. N. Engl. J. Med., 306:23-32, 1982.
- ⁴ Approved Standard – procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 5th Edition: H3-A5: 23(32), 2003, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
- ⁵ Approved guideline – procedures for the handling and processing of blood specimens, H18-A2; 19(21), 1999. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).
- ⁶ Schroff, RJ, Foon, KA, *et.al*: Human anti-mouse immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. Cancer Res, 45:879 – 885, 1985
- ⁷ Jackson, IM: Thyrotropin-releasing hormone. N. Engl. J. Med., 306: 145-155, 1982.
- ⁸ Pierce, JG: Subunits of Pituitary Thyrotropin. Their relationship to other glycoprotein hormones. Endocrinology, 89: 1331-1344, 1971.
- ⁹ Nicoloff JT, Spencer CA: The use and misuse of the sensitivity thyrotropin assays. J. Clin. Endocrinology, 71, 553 – 558, 1990.
- ¹⁰ Spencer CA: Thyroid profiling for the 1990's: free T4 estimate or sensitive TSH measurement. J. Clin Immunoassay, 12, 82 – 89, 1989.



Qualigen, Inc.
Carlsbad, CA 92011 USA
Technical Support
(760) 918-9165
(877) 709-2169



MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Germany



Zur quantitativen Messung von Thyreoidstimulierendem Hormon (TSH) in menschlichem Serum und Plasma

Die Konzentration von thyreoidstimulierendem Hormon (TSH) in einer beliebigen Probe, die durch Assays von verschiedenen Herstellern bestimmt wird, kann sich aufgrund von Unterschieden in den Assaymethoden und individuellen Eigenschaften von Reagenzien unterscheiden. Die Ergebnisse, die vom Labor an den Arzt weitergegeben werden, müssen die Identität der verwendeten TSH-Assaymethode enthalten. Werte, die durch unterschiedliche Assaymethoden erlangt werden, sollten nicht synonym verwendet werden.

ACHTUNG: Das US-Bundesgesetz beschränkt dieses Gerät auf den Verkauf oder die Weitergabe durch oder auf Verschreibung eines Arztes oder an ein Krankenhauslabor, und der Gebrauch ist beschränkt auf oder auf Verschreibung eines Arztes.

VERWENDUNGSZWECK

Das FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Immunoassay ist ein paramagnetisches Partikel-Immunoassay für die in-vitro Mengenbestimmung von TSH in menschlichem Serum oder Plasma. Die Messung des Thyreoidstimulierenden Hormons (TSH), das von der anterioren Hypophyse produziert wird, wird bei der Analyse von Thyreoid- oder Hypophysenstörungen verwendet. Das FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Immunoassay sind für den Gebrauch mit dem FastPack® IP-System und FastPack®-System vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG

Thyroidhormone (T4 und T3) haben viele Wirkungen und sind unentbehrlich für Wachstum, Entwicklung und sexuelle Reifung. Zu den Wirkungen gehören die Stimulation der Herzfrequenz und Herzkontraktion, Stimulation der Proteinsynthese und Kohlenhydratmetabolismus, Steigerung der Synthese und Senkung von Cholesterol und Triglyzeriden, Erhöhung der Vitaminanforderungen und Vergrößerung der Empfänglichkeit für Beta-Rezeptoren auf Katecholamine^{1,2}. Aus diesem Grund kann eine Schilddrüsenfehlfunktion eine umfassende Wirkung haben.

Zwischen der Schilddrüse, Hypothalamus und Hypophyse besteht eine eng koordinierte gegenseitige Abhängigkeit³. Die Systeme dieser Drüsen sind eng miteinander verknüpft und integriert, wodurch das Niveau des Schilddrüsenhormons im Blut geregelt wird. Thyrotropin abgebendes Hormon (TRH), ein Tripeptid, wird im Hypothalamus produziert. TRH wirkt auf die pituitären Thyrotrope, um die Synthese und Freigabe von TSH zu bewirken⁷. TSH kontrolliert schließlich die Synthese und Freigabe von Schilddrüsenhormonen. Ein Anstieg der Schilddrüsenhormonpegel verhindert die pituitäre Reaktion auf TRH. Ein Sinken des Schilddrüsenhormonpegels führt zu einem Anstieg der TRH- und TSH-Ausscheidung. Eine Fehlfunktion der regelnden Produktionspegel von Schilddrüsenhormonen (T4 und T3) führt zu einer Unterproduktion (Hypothyreose) oder Überproduktion (Hyperthyreose). Mit dem Aufkommen von sensiblen Immunoassays ist TSH zu einem der empfohlenen Analyten zur Beurteilung einer vermuteten Schilddrüsenfehlfunktion geworden.

Humanes thyreoidstimulierendes Hormon (hTSH) oder Thyrotropin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 28.000 Dalton, das durch die basophilen Zellen (Thyreotrope) des Hypophysenvorderlappens synthetisiert wird^{2,8}. hTSH besteht aus zwei nicht-kovalent verknüpften Untereinheiten, die aus Alpha (α) und Beta (β) bezeichnet werden. Die α-Untereinheit des hTSH ist bei vielen anderen Hormonen verbreitet (Follikel stimulierendes Hormon, FSH, luteinisierendes Hormon, LH, und humanes Choriongonadotropin, hCG), während die β-Untereinheit einzigartig ist und sowohl biologische als auch immunologische Spezifität überträgt. Für die biologische Aktivität werden die α- und β-Untereinheiten benötigt^{2,8}.

Das FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Immunoassay basiert auf dem Sandwich-Immunoassayprinzip: TSH in der Probe (Kontrolle oder Patient) wird während der ersten Inkubation wie ein Sandwich zwischen die beiden monoklonalen Antikörper gelegt. Der TSH-Antikörperkomplex wird dann an paramagnetischen Festphasenpartikel gebunden. Nach dem Waschen der Festphase, bei der ungebundene Reagenzien eliminiert werden, wird ein alkalisches Phosphatsubstrat hinzugefügt. Die Menge an Anti-TSH-Antikörpern, die an die paramagnetischen Partikel gebunden ist, ist direkt proportional zum TSH in der Probe.

TESTPRINZIPIEN

Das FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Immunoassay ist ein Chemilumineszenzassay auf dem Sandwich-Immunoassayprinzip.

- Primäre Inkubation: Antikörper-Lösung (eine Mischung aus einem biotinylierten, monoklonalen TSH-spezifischen Antikörper und einem monoklonalen TSH-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekennzeichnet ist) [100 µl] reagiert mit TSH aus der Patientenprobe, -kontrolle oder -kalibrator [100 µl].
- Sekundäre Inkubation: Mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel werden mit der Reaktionsmischung kombiniert. Während dieser Inkubation wird der Sandwich-Komplex durch die Interaktion von Biotin und Streptavidin an die Festphase gebunden.
- Entfernung nicht gebundenen Materials: Die paramagnetischen Partikel werden wiederholt mit Wäschepuffer [0,2 ml/Wäsche], ausgespült, um ungebundenes Material zu entfernen.

- Substrataddition und -erkennung: Chemilumineszierendes Substrat [140 µl] wird zum in der Festphase gebundenen Komplex hinzugefügt und führt zu einer „leuchtenden“ Chemilumineszenz, die mit dem FastPack® IP System und dem FastPack® System gemessen wird.
- Die Menge der gebundenen gekennzeichneten Antikörper ist direkt proportional zur Konzentration des TSH in der Probe.

REAGENZIEN - Inhalt und Konzentration

Jeder FastPack® IP-Karton enthält:

- 30 FastPack® IP

Jeder FastPack®-Karton enthält:

- 50 FastPacks

Jeder FastPack® IP TSH oder FastPack® TSH enthält:

- Paramagnetische Partikel, 150 µl
Mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel mit kovalent gebundenem Testosteron im Puffer mit 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.
- TSH-Antikörperlösung, 100 µl
Antikörperlösung mit einer Mischung aus biotinyliertem monoklonalen Anti-TSH-Antikörper der Maus und einem zweiten monoklonalen Anti-TSH-Antikörper der Maus, die mit alkalischer Phosphatase in einer Proteinmatrix mit Proclin® 150 als Konservierungsmittel gekennzeichnet ist.
- Waschpuffer: 2,0 ml
Tris-Puffer enthält Tenside.
- Substrat: 140 µl
ImmuGlow™: Indoxyl-3-phosphat und Lucigenin in Puffer mit Konservierungsmitteln.

Benötigte aber nicht mitgelieferte Materialien

- FastPack® IP System oder FastPack® System
- FastPack® TSH Calibrator Kit – Kat. Nr. 25000024
- FastPack® TSH Control Kit – Kat. Nr. 25000025

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur für *in-vitro* Diagnose.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In gekennzeichneten Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder essen.
- Nach dem Umgang mit Proben Hände gründlich waschen.
- HAMA-Interferenz: manche Menschen haben Antikörper gegen Mausprotein (HAMA), die zu Interferenzen bei Immunoassays führen kann, die aus Mäusen stammende Antikörper verwenden.⁶
- FastPack® IP-Reagenzien und FastPack®-Reagenzien sind bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums auf dem Etikett stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und gehandhabt werden. Verwenden Sie keine FastPack® IP-Reagenzien und FastPack®-Reagenzien, wenn sie schon abgelaufen sind.
- Entsorgen Sie gebrauchte FastPacks in einem Behälter für biologische Gefahrenstoffe.
- Die Bestandteile, die Natriumazid enthalten, sind gemäß der entsprechenden Richtlinien der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EWG) eingestuft als: Sehr giftig und umweltgefährdend (T+ N). Die folgenden sind Risiko- (R) und Sicherheitshinweise (S) für Natriumazid:

R28	Sehr giftig, wenn geschluckt wird.
R32	Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
R50/53	Sehr giftig für Wassertiere. Kann langfristige, negative Auswirkungen auf die Wasserumgebung verursachen.
S28	Nach Kontakt mit der Haut sofort mit viel Seifenlauge abwaschen.
S45	Bei einem Unfalls oder wenn Sie sich unwohl fühlen, sofort medizinischen Rat einholen (zeigen Sie wenn möglich das Etikett).
S60	Dieses Material und sein Behälter müssen als Sondermüll entsorgt werden.
S61	Vermeiden Sie die Freigabe an die Umwelt. Lesen Sie Sonderanweisungen/Sicherheitsdatenblätter.

LAGERANWEISUNG

Bei 2 – 8 °C lagern.

PROBENSAMMLUNG/-VORBEREITUNG

1. Serum und Plasmaproben können für das FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Immunoassay verwendet werden.
2. Das National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) gibt die folgenden Empfehlungen für die Handhabung, Verarbeitung und Lagerung von Blut.^{4,5}
 - A. Nehmen Sie alle Blutproben unter Berücksichtigung von Routinevorsichtsmaßnahmen bei der Venenpunktion.
 - B. Für Plasmaproben:
 - Sammeln Sie Proben in einem heparinisierten Röhrchen mit grüner Spitze.
 - Mischen Sie das Röhrchen sofort nach der Entnahme, indem Sie es mehrere Male umdrehen.

- Plasma sollte innerhalb von 3 Stunden nach der Blutentnahme durch Zentrifugieren von den Zellen getrennt und bei 2 – 8 °C gelagert werden. Nehmen Sie das Plasma zur Lagerung aus dem Originalröhrchen.
- Wenn die Probe nicht innerhalb von 24 Stunden getestet wird, sollte sich bei -20 °C oder kälter eingefroren werden. TSH in Plasma, wie es auf dem FastPack® IP System und Fastpack® System gemessen wird, ist bis zu drei Einfrier-/Auftauzyklen stabil.

C. Für Serumproben:

- Sammeln Sie Proben in Serum Blutentnahmeröhrchen.
- Stellen Sie sicher, dass sich vor der Zentrifugation Klumpen vollständig gebildet haben. Bei einigen Proben kann die Klumpenbildung länger dauern, insbesondere bei Patienten, die Gerinnungshemmer oder eine Thrombolysetherapie erhalten.
- Serum sollte innerhalb von 3 Stunden nach der Blutentnahme vom Klümpchen getrennt und zentrifugiert werden.
- Entfernen Sie Serum aus den Zellen, bevor es bei 2 – 8 °C gelagert wird.
- Wenn die Probe nicht innerhalb von 24 Stunden getestet wird, sollte sich bei -20 °C oder kälter eingefroren werden. TSH in Serum, wie es auf dem FastPack® IP System und Fastpack® System gemessen wird, ist bis zu drei Einfrier-/Auftauzyklen stabil.

D. Proben dürfen nicht länger als zwei Monate eingefroren (-20 °C) werden.

E. Proben dürfen keine rote Blutzellen oder andere Partikel enthalten, um optimale Ergebnisse zu erlangen.

F. Proben, die Trübung und Partikel zeigen, sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden.

G. Stellen Sie sicher, dass Proben blasenfrei sind.

ASSAYVERFAHREN

Genaue Anweisungen zum Durchführen von Assays mit dem FastPack® IP-System und FastPack® System finden Sie im Verfahrenshandbuch des FastPack® IP-Systems.

INSTRUMENTIERUNG

FastPack® IP System oder FastPack® System

DETAILS DER KALIBRIERUNG

Während des FastPack® IP und FastPack® Produktionsprozesses erzeugt Qualigen eine Master-Normkurve und speichert diese Informationen im Strichcode auf dem Etikett jedes FastPack® IP und FastPack®, wo sie vom Analysegerät des FastPack® IP-Systems oder FastPack®-Systems während der Testsequenz gelesen werden kann. Das Analysegerät muss vom Benutzer kalibriert werden, um sicherzustellen, dass es richtig auf das entsprechende Los der FastPacks geeicht ist, die verwendet werden. Für jede Art von Test müssen eigene Kalibrierungen durchgeführt werden, d. h. freier PSA, Gesamt-PSA oder Testosteron. Die Häufigkeit der Kalibrierung hängt von jedem Testtyp ab. Für FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Immunoassay muss das Analysegerät des FastPack® IP-Systems und FastPack®-System einmal alle 14 Tage oder dann kalibriert werden, wenn ein neues Los von TSH FastPacks verwendet wird.

Immer wenn der Benutzer eine erste Kalibrierung für ein bestimmtes Los von FastPacks durchführt oder ein neues Los von Kalibratoren verwendet, müssen 2 FastPacks zur Kalibrierung (Duplikate) verwendet werden. Wenn die Kalibrierung ausläuft (14 Tage nach der ersten Kalibrierung) müssen 2 FastPacks zur Kalibrierung verwendet werden. Siehe Verfahrenshandbuch des FastPack® IP-Systems zu „Durchführen einer Kalibrierung“.

Verwenden Sie einen FastPack® TSH Calibration Kit – Kat. Nr. 25000024

ERGEBNISSE

Das FastPack® IP System und FastPack® System Analysegerät verwendet die Informationen aus dem Strichcode, um eine Lookup-Tabelle mit x-/y-Werten, die die Normkurve darstellen und bestimmt die Konzentration unbekannter Proben durch lineare Interpolation.

QUALITÄTSSICHERUNG

Qualitätssicherungsmaterialien simulieren echte Proben und sind unerlässlich für die Überwachung der Systemleistung von Assays. Gute Laborpraxis umfasst den Einsatz von Kontrollproben, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien und Protokolle korrekt durchgeführt werden. Siehe Verfahrenshandbuch des FastPack® IP-Systems zu „Kontrolltest“. Es sollten mindestens zwei Stufen von Qualitätssicherungsmaterialien verwendet werden.

Anwender sollten immer Bundes-, Landes- und örtliche Richtlinien bezüglich der Durchführung externer Qualitätssicherungen befolgen.

Verfügbare Kontrollen: FastPack® TSH Control Kit – Kat. Nr. 25000025

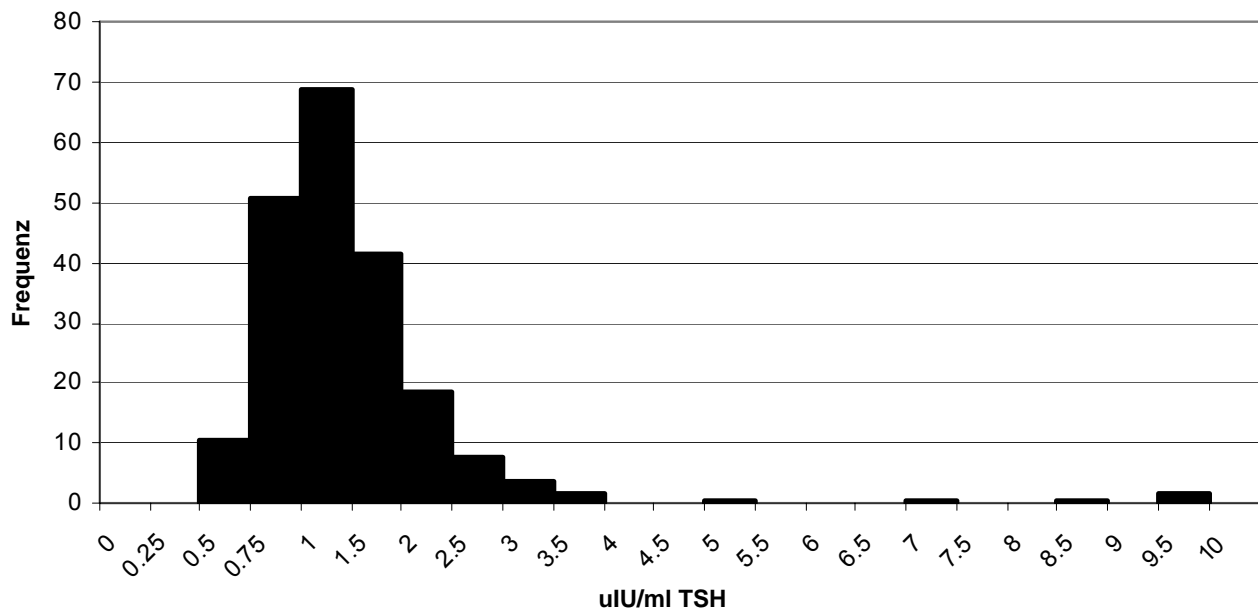
GRENZEN DES VERFAHRENS

- Plasmaproben werden mit Heparin als Antikoagulans entnommen.
- Proben können innerhalb des anzeigbaren Bereichs von 0,13 µIU/ml und dem oberen Ende des Kalibrierungsbereichs von 100 µIU/ml gemessen werden.
- Proben >100 µIU/ml sollten als solche aufgenommen oder mit einer anderen Methode noch einmal wiederholt werden. Proben können mithilfe des Nullkalibrators (Cal A) verdünnt werden, bis sie im Bereich des Assays liegen.
- FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Immunoassay zeigen keinen Hook-Effekt bis zu 5.000 µIU/ml.
- Proben von Patienten, die Präparate mit monoklonaren Antikörpern aus Mäusen zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, enthalten eventuell humane anti-Maus-Antikörper (HAMA). Solche Proben zeigen dann eventuell entweder falsch erhöhte oder gesenkte Werte, wenn sie mit Assaysätzen getestet werden, die monoklonale Antikörper der Maus enthalten.
- Heterophile Antikörper in einer Probe können Interferenzen in Immunoassay-Systemen verursachen. Ab und zu erscheinen TSH-Werte gesenkt, da heterophile Antikörper in der Probe des Patienten vorhanden sind oder aufgrund von nichtspezifischer Proteinbindung. Ist der TSH-Wert konsistent mit klinischen Beweisen, sollten weitere TSH-Tests durchgeführt werden, um das Ergebnis zu bestätigen.
- Zu Diagnosezwecken sollten das Fastpack® IP TSH und FastPack® TSH Immunoassay zusammen mit der Anamnese des Patienten, klinischen Untersuchungen und anderen Befunden beurteilt werden.
- Das TSH-Assay wurde noch nicht in patientennahen Situationen beurteilt.
- Die Leistung dieses Assays wurde nicht mit neonatalen Proben ermittelt.

ERWARTETE WERTE

Proben wurden von 211 Personen genommen. Die Proben wurden von offensichtlich gesunden Blutspendern ohne klinisch abnormale Kennzeichen entnommen. TSH-Werte wurden mit FastPack® IP TSH und Fastpack® TSH Immunoassay zusammen mit dem FastPack® IP System und FastPack® System bestimmt, um die TSH-Konzentration bei der normalen Bevölkerung zu ermitteln. Der normale Bereich (zentral 95 Perzentil) für FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Immunoassay liegt bei 0,66 - 5,45 µIU/ml. Der erwartete Bereich spiegelt die Spenderpopulation dieser Studiengruppe wider. Jedes Labor sollte den eigenen Referenzbereich für seine eigene Population bestimmen.

Frequenzverteilung der TSH-Werte
Basierend auf Qualigens FastPack® IP System
(n=211)



SPEZIFISCHE LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Präzision

Die Reproduzierbarkeit des TSH-Assays wurde durch Tests mit gemischten Plasmaproben in doppelter Ausführung über einen Zeitraum von zehn Tagen mithilfe von drei Analysegeräten und zwei Losen von Reagenzien gemessen. Die Präzision wird als Variationskoeffizient ausgedrückt. Die Proben, die zur Beurteilung der Präzision verwendet wurden, wurden über den linearen Bereich des Assays verteilt.

Probe	Anzahl Proben (N)	Mittel (µIU/ml)	Zwischen Durchgängen VK%	Zwischen Analysegerät VK%	Zwischen Reagenzlos VK%	GESAMT VK%
1	117	1,54	7,4	0,5	0,3	9,7
2	117	12,39	5,2	1,1	4,8	7,5
3	120	46,30	5,1	5,0	1,1	9,5

Zusätzlich zu den Proben oben wurden Kontrollmaterialien mit drei Analysegeräten und zwei Losen von Reagenzien getestet. Die Präzision wird als Variationskoeffizient ausgedrückt. Die Kontrollproben, die zur Beurteilung der Präzision verwendet wurden, klammern die erwarteten Werte für offensichtlich gesunde Personen ein.

Probe	Anzahl Proben (N)	Mittel (µIU/ml)	Zwischen Durchgängen VK%	Zwischen Analysegerät VK%	Zwischen Reagenzlos VK%	GESAMT VK%
1	48	0,54	13,8	13,3	4,0	20,0
2	48	4,69	6,0	5,8	4,8	7,0

Die Präzision bei Serumproben wurde mit der bei Plasmaproben über eine Analyse von passenden Proben verglichen, die den Bereich des Assays umfassen. Die Präzision wird als Variationskoeffizient ausgedrückt. Die Studie zeigte gleichwertige Leistung bei Serum- und Plasmaproben.

Probenkonzentrationsbereich	Anzahl Proben (N)	Plasma VK	Serum VK
0,0 - 1,0 µIU/ml	40	6,1%	7,0%
1,0 - 40,0 µIU/ml	101	4,4%	4,4%
40,0 - 100,0 µIU/ml	32	5,4%	4,0%

BEREICH DER LINEARITÄT

Serum

Der Bereich der Linearität bei Serum wurde gemäß der Richtlinie CLSI EP6-A beurteilt. Für TSH in Serum, wie sie durch das FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Assay getestet wurde, hat die Methode eine lineare Funktion von 0,11 µIU/ml (Nachweisgrenze) bis 100 µIU/ml innerhalb von 5 µIU/ml in diesem Intervall demonstriert.

Plasma

Der Bereich der Linearität bei Plasma wurde gemäß der Richtlinie CLSI EP6-A beurteilt. Für TSH in Plasma, wie sie durch das FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Assay getestet wurde, hat die Methode eine lineare Funktion von 0,08 µIU/ml (Nachweisgrenze) bis 100 µIU/ml innerhalb von 5 µIU/ml in diesem Intervall demonstriert.

METHODENVERGLEICH

FastPack® vs. Abbott IMx Ultrasensitive hTSH II

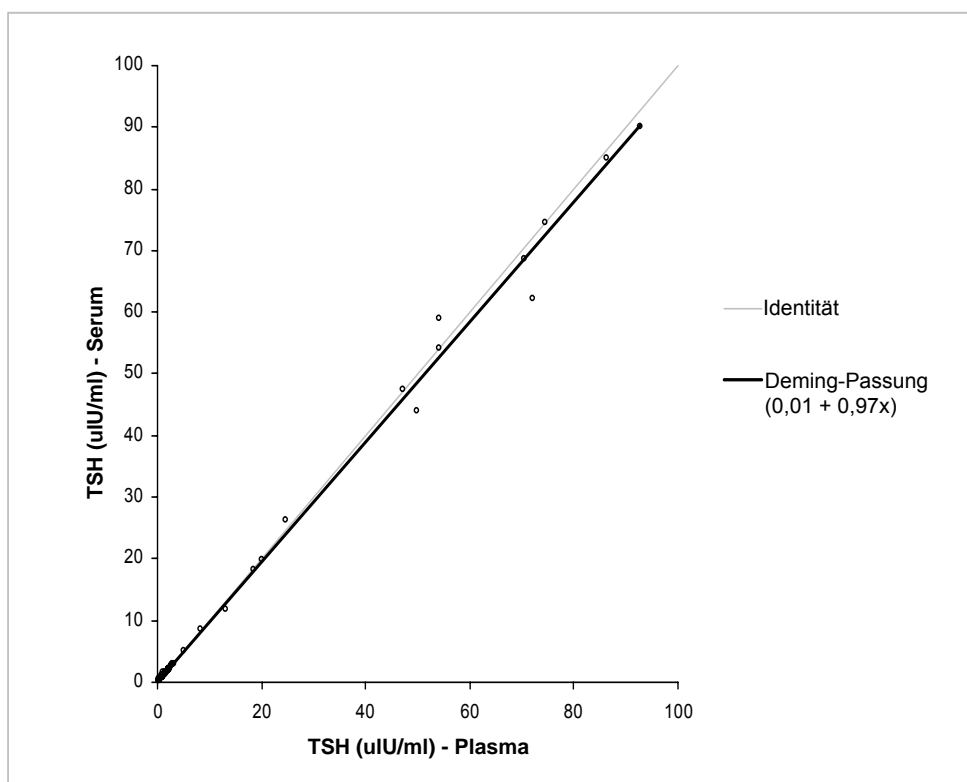
Es wurden klinische Proben (n=96, erhalten als gefrorene Plasmaproben über externe Labors) verwendet, um Plasmawerte, die über FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Methode erhalten wurden, mit Plasmawerten zu vergleichen, die mithilfe der Abbott IMx Ultrasensitive hTSH II Methode erhalten wurden. Die Werte wurden mithilfe der linearen Regressionsanalyse mit dem verbundenen Korrelationskoeffizienten auf Übereinstimmung hin beurteilt.

n	Beobachtungsbereich (µIU/ml)	Schnittpunkt (µIU/ml)	Steigung	R
96	0,03 bis 87,99	0,83	1,03	0,97

FastPack® Serum vs. FastPack® Plasma

Blutspenden wurden von 74 gesunden männlichen und weiblichen Freiwilligen im Alter zwischen 18 und 60 Jahren gesammelt und diese Proben wurden parallel zu Heparinplasma und Serumproben verarbeitet. Die Werte wurden mithilfe des Deming-Regressionstests mit dem verbundenen Korrelationskoeffizienten auf Übereinstimmung hin beurteilt.

n	Beobachtungsbereich (µIU/ml)	Schnittpunkt (µIU/ml)	Steigung	R
74	0,22 – 92,75 (Heparinplasma)			
74	0,24 – 90,00 (Serum)	0,01	0,97	1,00



STÖRENDE SUBSTANZEN

Störende Substanzen wurden zu drei Serumproben und einer Plasmaprobe mit bekannten TSH-Mengen hinzugefügt. Der erhaltene Wert für die Serum- oder Plasmaprobe mit jeder störenden Substanz wurde mit dem Wert verglichen, der ohne die störenden Substanzen für das Serum oder Plasma erhalten wurde. Ein Annahmekriterium von $\pm 20\%$ des Werts für die Serum- oder Plasmaprobe ohne hinzugefügte störende Substanz wurde für die Studie vorher festgelegt. Diese Verbindungen zeigten keine Interferenz bei den angezeigten Stufen.

Serumproben TSH-Konzentrationen ($\mu\text{IU/ml}$)	Störende Substanz	Konzentration störende Substanz	% Interferenz
1,0, 5,0, 20,0	Bilirubin	40 mg/dl	< 10
1,0, 5,0, 20,0	Hämoglobin	1.000 mg/dl	< 20
1,0, 5,0, 20,0	Triglyzeride	1.000 mg/dl	< 5

Plasmaprobe TSH-Konzentration ($\mu\text{IU/ml}$)	Störende Substanz	Konzentration störende Substanz	% Interferenz
1,85	Bilirubin	40 mg/dl	< 5
1,63	Hämoglobin	1.000 mg/dl	< 5
1,63	Triglyzeride	1.000 mg/dl	< 10

ERFASSUNGSGRENZE (LOB), NACHWEISGRENZE (LOD) UND BESTIMMUNGSGRENZE (LOQ)

Die Erfassungsgrenze (LOB, die höchste Messung, die für eine leere Probe wahrscheinlich festgestellt wird), Nachweisgrenze (LOD, der niedrigste Analytwert in einer Probe, der mit Fehlerraten Typ I und II auf 5% festgelegt erkannt werden kann) und Bestimmungsgrenze (LOQ, der niedrigste Analytwert in einer Probe, der zuverlässig erkannt werden kann und bei dem der Gesamtfehler die vorher definierte Anforderung für Genauigkeit erfüllt) wurden für Serum und Plasma gemäß CLSI EP 17-A bestimmt. In dieser Studie wurde die Erfassungsgrenze aus 60 Wiederholungsbestimmungen von defibriniertem, entlipidisiertem, doppelt durch Aktivkohle gefiltertem Serum bestimmt. Rohe RLUs aus den Assays wurden in sichtbare $\mu\text{IU/ml}$ basierend auf der Kalibrierungskurve für jedes Assay konvertiert. Für jeden Probenotyp wurde die Erfassungsgrenze als nicht-parametrischer 95. Perzentil der Werteverteilung bestimmt. Dieser Wert war 0,016 $\mu\text{IU/ml}$ TSH für Serumproben und 0,019 $\mu\text{IU/ml}$ TSH für Plasmaproben.

Für Serumproben wurde die Nachweisgrenze aus 60 Wiederholungsbestimmungen mit drei schwachen Serumproben ermittelt. Basierend auf den Normalverteilungen wurde die Nachweisgrenze mithilfe der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{LOD} = \text{LOB} + (c_B \times \text{SD}_S),$$

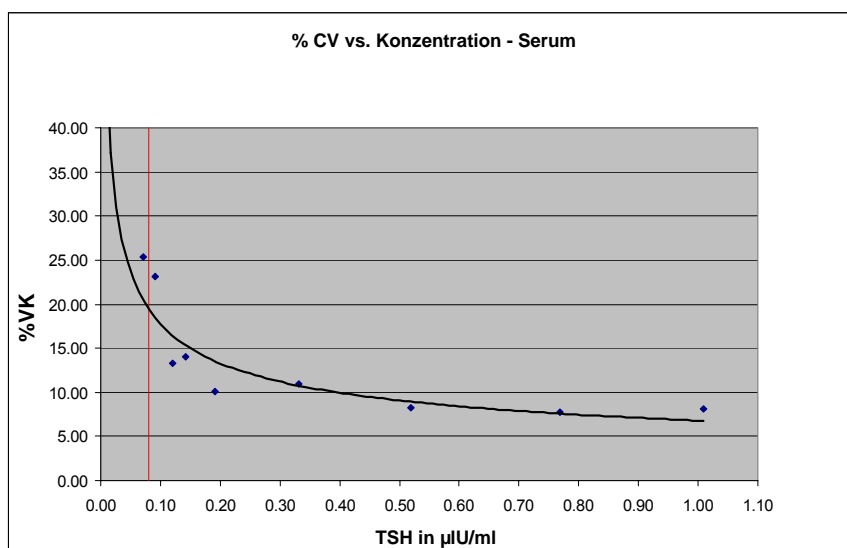
Wo $c_B = 1,645/(1-(1/(4 \times f)))$, wo f der Freiheitsgrad und SD_S die Standardabweichung der Beobachtungen ist. In dieser Studie lag die gefundene Nachweisgrenze bei 0,11 $\mu\text{IU/ml}$ TSH.

Für Plasmaproben wurde die Nachweisgrenze aus 60 Wiederholungsbestimmungen mit sechs schwachen Plasmaproben ermittelt. Basierend auf den Normalverteilungen wurde die Nachweisgrenze durch die Identifikation der niedrigsten Probe mit Werten bestimmt, die <5% Überlappung mit leeren Werten zeigte. Diese Konzentration wurde mit 0,08 $\mu\text{IU/ml}$ TSH bestimmt.

Für die Bestimmung der LOQ in Serum und Plasma lagen die voraussichtlich definierten Annahmekriterien für Genauigkeit bei 80-120% Erholung vom Zielwert der schwachen Proben und <20% VK. In dieser Studie erfüllte eine Serumprobe mit einem zugewiesenen Wert von 0,127 $\mu\text{IU/ml}$ TSH die Annahmekriterien. Für Plasma erfüllte eine Probe mit einem zugewiesenen Wert von 0,129 $\mu\text{IU/ml}$ TSH die Annahmekriterien.

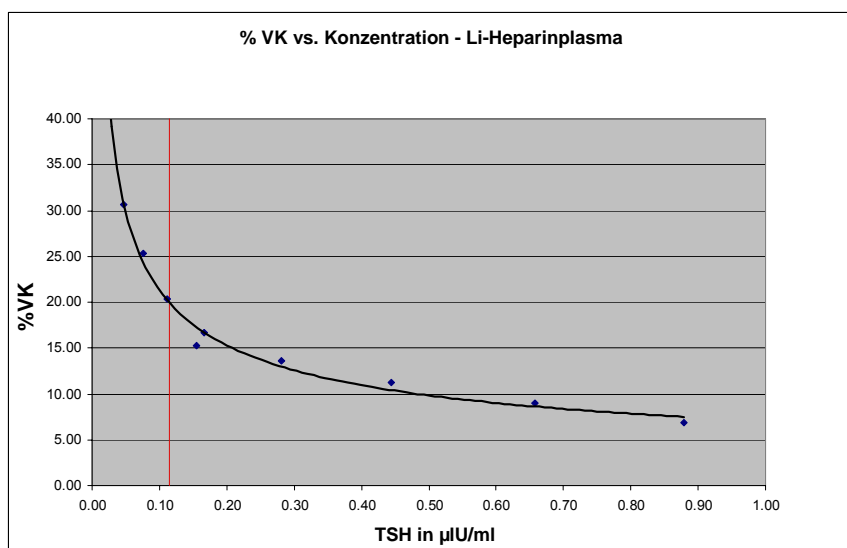
FUNKTIONSEMPFINDLICHKEIT IN SERUM UND HEPARINPLASMA

Die Funktionsempfindlichkeit, die als Konzentration in $\mu\text{IU/ml}$ TSH definiert ist, bei der das Assay ein VK von 20% angezeigt, wurde für Serumproben und Lithiumheparinplasmaproben bestimmt. Für beide Methoden umfasste die Untersuchung die Zubereitung von 9 Proben in der festgelegten Matrix, die einen Bereich von ~0,05 bis 1 $\mu\text{IU/ml}$ TSH umfasste, gefolgt von einer Assay jedes Probe in 30 Wiederholungsbestimmungen (6 Wiederholungen/Tag über 5 Testtage) mit einem Los FastPack® TSH-Reagenzien. Die mittlere Standardabweichung (SA) und % VKs wurden aus dem Wiederholungsbestimmungen berechnet. Die mittlere TSH-Konzentration für jede Probe wurde dann gegen % VK dargestellt und die Daten über eine Leistungsfunktion der Formel Ae^{kx} angepasst. Die Konzentration, bei der 20% VK erreicht wurde, wurde dann aus den angepassten Daten identifiziert. Die folgende Darstellung zeigt die Beziehung zwischen mittlerer Konzentration und % VK. Die vertikale Linie in der Grafik zeigt den Punkt, bei dem 20% VK erreicht wird. Für das FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Serumassay wird dieser Punkt bei 0,08 $\mu\text{IU/ml}$ TSH erreicht. Entsprechend wird die Funktionsempfindlichkeit des FastPack® IP TSH und FastPack® TSH Serumassays auf 0,08 $\mu\text{IU/ml}$ TSH geschätzt.



Funktionsempfindlichkeit in TSH-Lithiumheparinplasma

Die folgende Darstellung zeigt die Beziehung zwischen mittlerer Konzentration und % VK. Die vertikale Linie in der Grafik zeigt den Punkt, bei dem 20% VK erreicht wird. Für das FastPack[®] IP TSH und FastPack[®] TSH Heparinplasmaassay wird dieser Punkt bei 0,115 µIU/ml TSH erreicht. Entsprechend wird die Funktionsempfindlichkeit des FastPack[®] IP TSH und FastPack[®] TSH Heparinplasmaassay auf 0,115 µIU/ml TSH geschätzt.



SPEZIFIZITÄT

Serum

Drei Pools mit Serumproben wurden zubereitet, um Konzentrationen von ~1, 5 und 20 µIU/ml TSH zu erreichen. Jede Probe wurde in vier Teilproben aufgeteilt, von denen drei mit hCG, LH und FSH mit Konzentrationen von 200.000, 500 und 500 µIU/ml versetzt wurden. Die Proben wurden zusammen mit der nicht versetzten Referenzprobe in fünf Replikaten jeweils auf zwei FastPack[®]-Instrumenten mit einem Los Testpaketen getestet. Die Daten wurden auf %-Unterschied gegenüber der Referenzprobe analysiert, die keine versetzten Antigene enthielt. Ein Annahmekriterium von ± 20% des nicht versetzten Referenzwerts wurde für die Studie vorher festgelegt. In keinem Fall haben die versetzten Antigene die Erholung im mehr als 20% verändert.

Plasma

Von TSH befreites Plasma wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von hCG, FSH und LH versetzt, um zu bestimmen, ob diese Materialien ein positives TSH-Signal im Assay erzeugten. Kreuzreaktivität des Antikörpers, der im FastPack® IP TSH and FastPack® TSH Assay verwendet wurde, zeigte sich als nicht erkennbar für hCG, LH und FSH, die jeweils bei 200.000, 500 und 500 mIU/ml getestet wurden.

REFERENZEN

- ¹ Braverman, LE, Utigen, RD, Eds: Werner and Ingbar's The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text. 7th ed., Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996.
- ² Burtis, CA, Ashwood, ER, Eds: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed., New York, WB Saunders Company, p. 1492, 1999.
- ³ Larsen, PR: Thyroid-pituitary interaction. N. Engl. J. Med., 306:23-32, 1982.
- ⁴ Approved Standard – procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 5th Edition: H3-A5: 23(32), 2003, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
- ⁵ Approved guideline – procedures for the handling and processing of blood specimens, H18-A2; 19(21), 1999. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).
- ⁶ Schroff, RJ, Foon, KA, *et.al*: Human anti-mouse immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. Cancer Res, 45:879 – 885, 1985
- ⁷ Jackson, IM: Thyrotropin-releasing hormone. N. Engl. J. Med., 306: 145-155, 1982.
- ⁸ Pierce, JG: Subunits of Pituitary Thyrotropin. Their relationship to other glycoprotein hormones. Endocrinology, 89: 1331-1344, 1971.
- ⁹ Nicoloff JT, Spencer CA: The use and misuse of the sensitivity thyrotropin assays. J. Clin. Endocrinology, 71, 553 – 558, 1990.
- ¹⁰ Spencer CA: Thyroid profiling for the 1990's: free T4 estimate or sensitive TSH measurement. J. Clin Immunoassay, 12, 82 – 89, 1989.



Qualigen, Inc.
Carlsbad, CA 92011 USA
Technischer Support
(760) 918-9165
(877) 709-2169



MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Deutschland



Pro kvantitativní stanovení hormonu stimulujícího štítnou žlázu (TSH) v lidském séru a plazmě

Koncentrace hormonu stimulujícího štítnou žlázu (TSH) v daném vzorku určená analýzami různých výrobců se může lišit v důsledku rozdílů v analyzačních metodách a specifitě činidel. Výsledky oznámené laboratorii lékaři musí zahrnovat identitu použité metody analýzy TSH. Hodnoty získané různými metodami analýzy by neměly být vzájemně zaměňované.

UPOZORNĚNÍ: Federální zákony Spojených států omezují prodej a distribuci tohoto prostředku na objednávku lékaře nebo klinické laboratoře a jeho použití je omezeno na lékaře nebo na základě jejich objednávky.

ZAMÝŠLENÝ ÚČEL

Imunoanalýza FastPack® IP TSH a FastPack® TSH je imunoanalýza paramagnetických částic pro kvantitativní *in vitro* stanovení TSH v lidském séru a plazmě. Měření hormonu stimulujícího štítnou žlázu (TSH) produkovaného přední hypofýzou se používá při diagnostice poruch štítné žlázy a hypofýzy. Imunoanalýza FastPack® IP TSH a FastPack® TSH je navržena pro použití se systémem FastPack® IP a FastPack®.

SOUHRN

Thyroidní hormony (T4 a T3) mají mnoho účinků a jsou nezbytné pro růst, vývoj a pohlavní dospívání. Účinky zahrnují stimulaci srdečního rytmu a srdečních kontrakcí, stimulaci syntézy bílkovin a metabolismus uhlohydrátů, zvýšení syntézy a rozkladu cholesterolu a triglyceridů, zvýšení příjmu vitamínů a posílení citlivosti β -adrenergických receptorů na katecholaminy^{1,2}. Proto může mít porucha štítné žlázy závažný globální účinek.

Existuje úzce koordinovaná zpětná vazba mezi štítnou žlázou, hypotalamem a hypofýzou³. Systémy těchto žláz jsou těsně vzájemně provázané a integrované, přičemž výsledkem je udržování hladin hormonů štítné žlázy v krvi. Hormon uvolňující tyrotropin (TRH), tripeptid, je vytvářen v hypotalamu. TRH působí na tyrotropy hypofýzy a způsobuje syntézu a uvolňování TSH⁷. TSH naopak reguluje syntézu a uvolňování hormonů štítné žlázy. Zvýšení hladin hormonů štítné žlázy inhibuje reakci hypofýzy na TRH. Pokles hladin hormonů štítné žlázy způsobuje zvýšení sekrece TRH a TSH. Selhání tvorby hormonů štítné žlázy (T4 a T3) na jakékoli regulační úrovni způsobí nedostatečnou produkci (hypotyreóza) nebo přílišnou produkci (hypertyreóza). S nástupem citlivých imunoanalýz se TSH stal jedním z doporučených analytů pro posouzení podezření na dysfunkci štítné žlázy.

Lidský hormon stimulující štítnou žlázu (hTSH), nebo-li tyrotropin, je glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 28 000 Daltonových jednotek syntetizovaný v bazofilních buňkách (tyrotropy) přední hypofýzy^{2,8}. hTSH se skládá ze dvou nekovalentně spojených podjednotek označovaných alfa (α) a beta (β). Část α z hTSH je společná pro několik dalších hormonů (folikuly stimulující hormon, FSH, luteinizační hormon, LH a lidský choriový gonadotropin, hCG), avšak část β je jedinečná a vykazuje biologickou i imunologickou specifitu. Pro biologický účinek jsou zapotřebí části α i β ^{2,8}.

Imunoanalýza FastPack® IP TSH a FastPack® TSH je založena na principu nekompetitivní (sendvičové) imunoanalýzy: TSH ve vzorku (kontrolní roztok nebo vzorek pacienta) je uzavřen mezi vrstvy dvou monoklonálních protilátek během první inkubace. Komplex TSH-protilátka je potom navázán na pevné paramagnetické částice. Po promytí pevné fáze pro odstranění nenavázaných činidel je přidán substrát alkalické fosfatázy. Množství značené protilátky anti-TSH navázané na paramagnetické částice je přímo úměrné koncentraci TSH ve vzorku.

ZKUŠEBNÍ PRINCIP

Imunoanalýza FastPack® IP TSH a FastPack® TSH je chemiluminiscenční analýza založena na principu nekompetitivní (sendvičové) analýzy:

- Primární inkubace: Roztok protilátky (směs biotinylované monoklonální protilátky specifické na TSH a monoklonální protilátky označené alkalickou fosfatázou) [100 μ l] reaguje s TSH ze vzorku pacienta, z kontrolního nebo kalibračního roztoku [100 μ l].
- Sekundární inkubace: Paramagnetické částice se streptavidinovým povrchem jsou kombinovány v reakční směsi. Během této inkubace se „sendvičový“ komplex naváže na pevnou fázi interakcí mezi biotinem a streptavidinem.
- Odstranění nenavázaných materiálů: Paramagnetické částice jsou opakovaně opláchnuty promývacím tlumivým roztokem [0,2 ml/promytí] pro odstranění nenavázaných materiálů.
- Přidání substrátu a detekce: K pevnému komplexu je přidán chemiluminogenní substrát [140 μ l] a výsledkem je „zřetelná“ chemiluminiscence, která se měří systémem FastPack® IP a FastPack®.
- Množství vázané značené protilátky částice je přímo úměrné koncentraci TSH ve vzorku.

ČINIDLA – obsah a koncentrace

Každá krabička FastPack® IP obsahuje:

- 30 ks FastPack® IP

Každá krabička FastPack® obsahuje:

- 50 ks FastPack

Každé balení FastPack® IP TSH nebo FastPack® TSH obsahuje:

- Paramagnetické částice, 150 µl
Paramagnetické částice pokryté streptavidinem v tlumivém roztoku obsahujícím 0,1 % azid sodný jako konzervační prostředek.
- Roztok protilátky TSH, 100 µl
Roztok protilátky obsahující směs biotinylované myší monoklonální protilátky anti-TSH a druhou myší monoklonální protilátku anti-TSH označenou alkalickou fosfatázou v proteinové matrici obsahující Proclin® 150 jako konzervační látku.
- Promývací tlumivý roztok, 2,0 ml
Tlumivý roztok Tris s obsahem tenzidů.
- Substrát, 140 µl
ImmuGlow™: Indoxyl-3-fosfát a lucigenin v tlumivém roztoku obsahujícím konzervační látku.

Vyžadované materiály, které nejsou součástí sady

- Systém FastPack® IP nebo FastPack®
- Sada kalibračních roztoků FastPack® TSH – kat. č. 25000024
- Sada kontrolních roztoků FastPack® TSH – kat. č. 25000025

VÝSTRAHY A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Pouze pro diagnostiku *in vitro*.
- Nepipetujte ústy.
- Nejezte, nepijte a nekuřte v určené pracovní oblasti.
- Po manipulaci se vzorkem si důkladně umyjte ruce.
- Rušení HAMA: Někteří jedinci mají protilátky pro myší protein (HAMA), které mohou způsobit rušení u imunoanalýz využívajících protilátky odvozené od myších⁶.
- Činidla FastPack® IP a FastPack® jsou stabilní až do data expirace na štítku, pokud jsou uloženy a nakládá se s nimi podle pokynů. Nepoužívejte činidla FastPack® IP a FastPack® po datu expirace.
- Použité FastPack vyhodte do nádoby na biologicky nebezpečný materiál.
- Složky obsahující azid sodný jsou příslušnými směrnici Evropské unie (EU) klasifikovány jako: velmi jedovaté a nebezpečné pro životní prostředí (T+ N). Pro azid sodný platí následující rizikové (R) a bezpečnostní (S) věty:

R28	Vysoce toxický při požití.
R32	Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami.
R50/53	Vysoce toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí.
S28	Při styku s kůží okamžitě omyjte velkým množstvím mýdlového roztoku.
S45	V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení)
S60	Tento materiál a jeho obal musí být zneškodněny jako nebezpečný odpad.
S61	Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Viz speciální pokyny nebo bezpečnostní listy.

POKYNY PRO SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2 – 8 °C.

ODBĚR A PŘÍPRAV VZORKŮ

1. Pro imunoanalýzu FastPack® IP TSH a FastPack® TSH lze použít sérové a plazmové vzorky.
2. Národní komise pro klinické laboratorní standardy (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) poskytuje doporučení pro zacházení, zpracování a ukládání krve.^{4, 5}
 - A. Všechny vzorky krve odebírejte za dodržení běžných bezpečnostních zásad odběru krve.
 - B. Vzorky plazmy:
 - Odeberte vzorky do heparinové (zelený uzávěr) zkumavky.
 - Ihned po odběru zkumavku promíchejte tak, že ji několikrát šetrně převrátíte.
 - Plazmu je třeba oddělit od buněk odstředováním během 3 hodin po odběru a uložit při teplotě 2 – 8 °C. Přeneste plazmu z původní zkumavky do skladovací.
 - Pokud není testován během 24 hodin, měl by být vzorek zmrazen při –20 °C nebo nižší teplotě. TSH v plazmě měřené systémem FastPack® IP a FastPack® je stabilní až po tři cykly zmražení/rozmražení.
 - C. Sérové vzorky:
 - Odeberte vzorky do odběrných zkumavek na krev.
 - Před odstředěním ověřte, že došlo k úplné tvorbě sraženiny. Některé vzorky mohou vykazovat zvýšenou dobu srážení, zejména vzorky od pacientů užívajících antikoagulační nebo trombolytickou léčbu.
 - Sérum by mělo být odděleno od sraženiny a odstředěno během 3 hodin po odběru.

- Před uložením oddělte sérum od buněk a uložte při teplotě 2–8 °C.
 - Pokud není testován během 24 hodin, měl by být vzorek zmražen při –20 °C nebo nižší teplotě. TSH v séru měřené systémem FastPack® IP a FastPack® je stabilní až po tři cykly zmražení/rozmražení.
- D. Nezmrazujte vzorky (–20 °C) na více než dva měsíce.
- E. Pro dosažení optimálních výsledků by vzorky neměly obsahovat fibrin, červené krvinky nebo jiné částice.
- F. Vzorky vykazující zákal a stopy částicového materiálu je třeba před použitím odstředit.
- G. Zkontrolujte, že vzorky neobsahují bubliny.

POSTUP ANALÝZY

Další informace o používání systému FastPack® IP a FastPack® naleznete v návodu pro postup pro systém FastPack® IP.

PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Systém FastPack® IP nebo FastPack®

PODROBNOSTI O KALIBRACI

Během výrobního procesu FastPack® IP a FastPack® připravuje společnost Qualigen hlavní standardní křivku a ukládá tuto informaci na čárový kód na štítku každého FastPack® IP a FastPack®, ze kterého ji načítá analyzátor FastPack® IP v průběhu testovací sekvence. Analyzátor FastPack® IP musí být kalibrován koncovým uživatelem pro zajištění, že je správně nastaven pro konkrétní FastPack, který se používá. Pro každý typ testu je třeba provést samostatnou kalibraci, například celkové PSA, testosteron nebo TSH. Četnost kalibrace se liší pro každý typ testu. Pro imunoanalýzu FastPack® IP TSH a FastPack® TSH musí být analyzátor FastPack® IP kalibrován jednou za 14 dní nebo před každým použitím nové šarže balení TSH FastPack.

Kdykoli uživatel provádí kalibraci pro konkrétní šarži FastPack nebo využívá novou šarži kalibračních roztoků, je třeba pro kalibraci analyzovat 2 ks FastPack (duplicitně). Když dojde k expiraci kalibrace (14 dní po počáteční kalibraci) musí se provést kalibrace se 2 ks FastPack. Viz návod k postupu pro systém FastPack® IP v části „Provádění kalibrace“.

Použijte sadu kalibračních roztoků FastPack® TSH – kat. č. 25000024

VÝSLEDKY

Analyzátor systému FastPack® IP a FastPack® využívá informace z čárového kódu pro sestavení tabulky hodnot x a y, které znázorňují standardní křivku, a odhaduje koncentraci neznámého vzorku lineární interpolací.

KONTROLA KVALITY

Materiály pro kontrolu kvality simulují reálné vzorky a jsou nezbytné pro sledování výkonu systému při analýze. Správná laboratorní praxe (GLP) zahrnuje použití kontrolních vzorků pro zajištění, že jsou všechna činidla a postupy správné. Viz návod k postupu pro systém FastPack® IP v části „Provádění kontrol“. Je třeba použít nejméně dvě úrovně materiálů kontroly kvality.

Uživatelé by měli postupovat podle příslušných federálních, státních a místních pokynů týkajících se provádění externích kontrol kvality.

Dostupné kontrolní roztoky: Sada kontrolních roztoků FastPack® TSH – kat. č. 25000025

OMEZENÍ POSTUPU

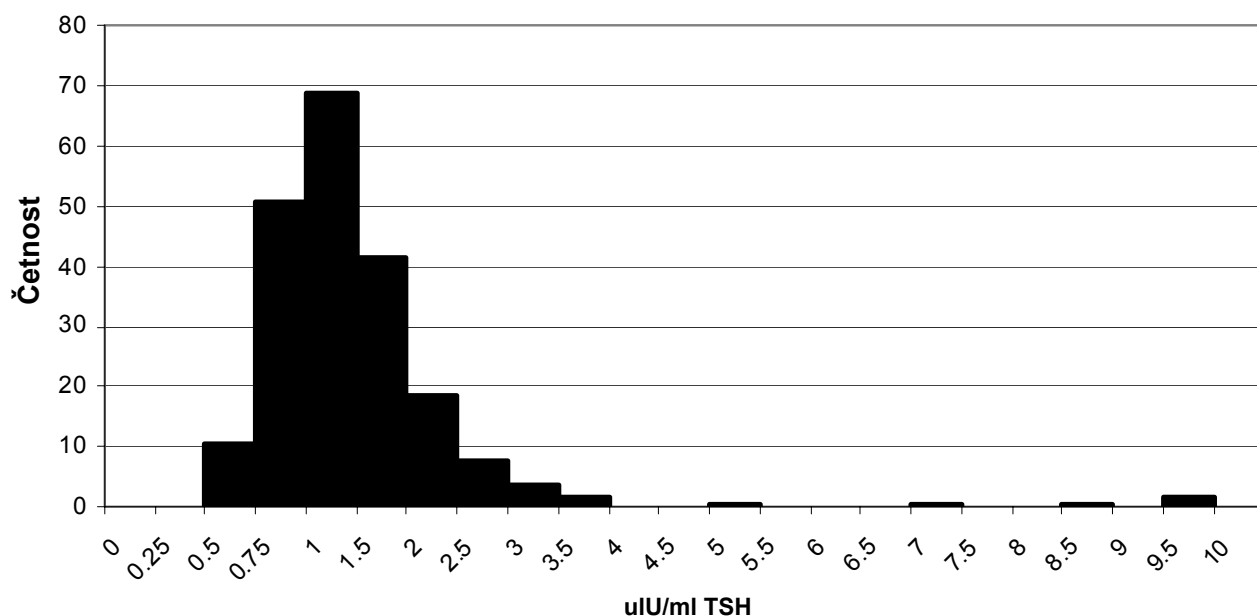
- Plazmové vzorky se odebírají za využití heparinu jako antikoagulantu.
- Vzorky lze měřit ve vykazovaném rozsahu 0,13 µIU/ml až do horního okraje kalibračního rozsahu, 100 µIU/ml.
- Vzorky >100 µIU/ml je třeba vykázat jako takové, nebo použít jinou metodu. Vzorky mohou být zředěny pomocí kalibračního roztoku nulové hodnoty (Cal A) pro dosažení rozsahu analýzy.
- Imunoanalýza FastPack® IP TSH a FastPack® TSH nevykazuje snížení výsledku při vysoké hodnotě až do 5 000 µIU/ml.
- Vzorky od pacientů, kteří z diagnostických nebo léčebných důvodů užívali přípravky obsahující myši monoklonální protilátky, mohou obsahovat protilátky proti myším proteinům (HAMA). Takové vzorky mohou vykazovat buď falešně zvýšené, nebo snížené hodnoty při testování analyzační sadou používající myši monoklonální protilátky.
- Heterofilní protilátky ve vzorky mají potenciál způsobit rušení systémů imunoanalýzy. Ve vzácných případech se mohou hladiny TSH jevit jako snížené v důsledku heterofilních protilátek přítomných v séru pacienta nebo nespecifického vázání bílkovin. Pokud je hladina TSH nekonzistentní s klinickým nálezem, doporučuje se pro ověření výsledku provést další zkoušení TSH.
- Pro diagnostické účely by měla být imunoanalýza FastPack® IP TSH a FastPack® TSH vždy posuzována ve spojení se zdravotní anamnézou pacienta, klinickým vyšetřením a dalšími nálezy.

- Analýza TSH nebyla posouzen v prostředí zdravotnického zařízení.
- Výkon analýzy nebyl stanoven pro novorozenecké vzorky.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Byly získány vzorky od 211 jedinců. Vzorky byly získány od normální dárce se zdravou krví bez jakýchkoli klinicky abnormálních indikací. Hladiny TSH byly určeny imunoanalýzou FastPack® IP TSH a FastPack® TSH ve spojení s analyzátořem systému FastPack® IP a FastPack® s cílem určit koncentraci TSH u normální populace. Na základě těchto dat je pro imunoanalýzu FastPack® IP TSH a FastPack® TSH očekávaný normální rozsah 0,66 – 5,45 $\mu\text{IU/ml}$. Tento očekávaný rozsah odráží dárcovskou populaci v této studované skupině. Každá laboratoř by měla určit vlastní referenční rozsah vhodný pro jejich populaci.

Distribuce četností hodnot TSH
Na základě systému FastPack IP® od Qualigen
(n = 211)



SPECIFICKÉ VÝKONOVÉ CHARAKTERISTIKY

Přesnost

Reprodukovatelnost analýzy TSH byla měřena testováním sloučených vzorků plasmy duplicitně pro každý vzorek v průběhu deseti dní za použití třech analyzátořů a dvou šarží činidel. Přesnost je vyjádřena jako variační koeficient. Vzorky použité k posouzení přesnosti byly rozloženy v celém lineárním rozsahu analýzy.

Vzorek	Počet vzorků (N)	Průměr ($\mu\text{IU/ml}$)	Mezi stanoveními % CV	Mezi analyzátoři % CV	Mezi šaržemi činidel % CV	CELKOVÉ % CV
1	117	1,54	7,4	0,5	0,3	9,7
2	117	12,39	5,2	1,1	4,8	7,5
3	120	46,30	5,1	5,0	1,1	9,5

Kromě výše uvedených vzorků byly testovány kontrolní materiály za použití třech analyzátořů a dvou šarží činidel. Přesnost je vyjádřena jako variační koeficient. Kontrolní vzorky pro posouzení přesnosti odpovídaly očekávaným hodnotám pro zjevně zdravé jedince.

Vzorek	Počet vzorků (N)	Průměr ($\mu\text{IU/ml}$)	Mezi stanoveními % CV	Mezi analyzátoři % CV	Mezi šaržemi činidel % CV	CELKOVÉ % CV
1	48	0,54	13,8	13,3	4,0	20,0
2	48	4,69	6,0	5,8	4,8	7,0

Přesnost pro sérové vzorky byly porovnány s přesností plazmových vzorků prostřednictvím analýzy odpovídajících vzorků pokrývajících celý rozsah analýzy. Přesnost je vyjádřena jako variační koeficient. Studie prokázala ekvivalentní výsledky u sérových i plazmových vzorků.

Rozsah koncentrací vzorků	Počet vzorků (N)	CV pro plazmu	CV pro sérum
0,0 - 1,0 µIU/ml	40	6,1 %	7,0 %
1,0 - 40,0 µIU/ml	101	4,4 %	4,4 %
40,0 - 100,0 µIU/ml	32	5,4 %	4,0 %

ROZSAH LINEARITY

Sérum

Rozsah linearity pro sérové vzorky byl posuzován podle pokynů CLSI EP6-A. Pro TSH v séru při testování analýzou FastPack® IP TSH a FastPack® TSH bylo prokázáno, že je metoda lineární od 0,11 µIU/ml (mez detekce) do 100 µIU/ml v rozmezí 5 µIU/ml v tomto intervalu.

Plazma

Rozsah linearity pro plazmové vzorky byl posuzován podle pokynů CLSI EP6-A. Pro TSH v plazmě při testování analýzou FastPack® IP TSH a FastPack® TSH bylo prokázáno, že je metoda lineární od 0,08 µIU/ml (mez detekce) do 100 µIU/ml v rozmezí 5 µIU/ml v tomto intervalu.

SROVNÁNÍ METOD

FastPack® vs. Abbott IMx Ultrasensitive hTSH II

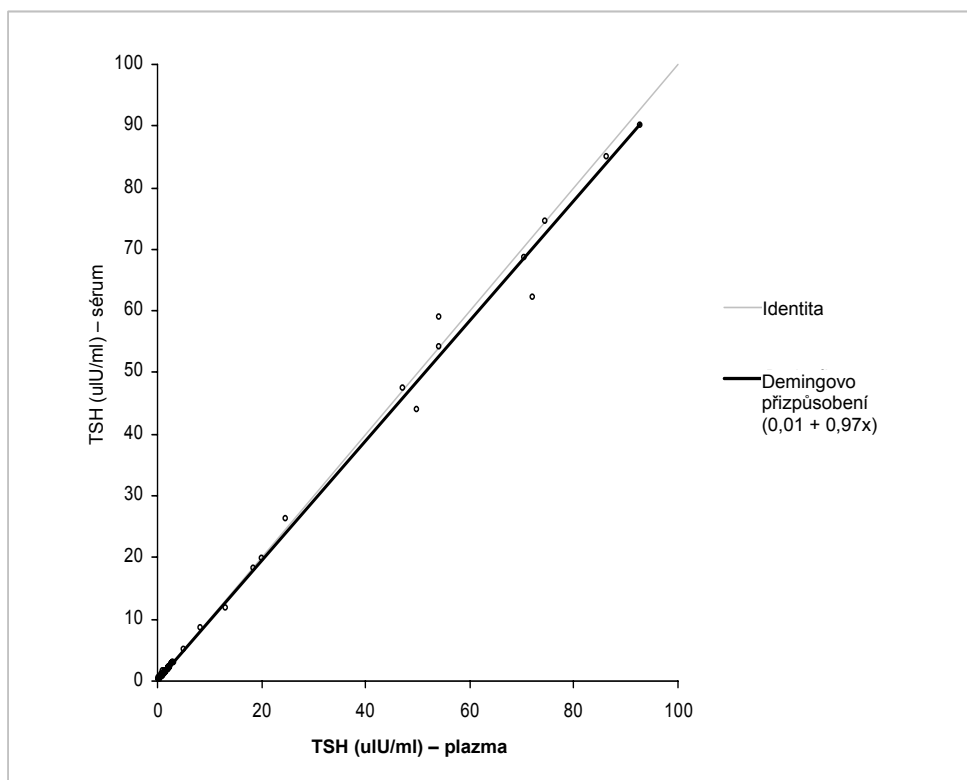
Klinické vzorky (n= 96 získané jako zmrazené vzorky plazmy v externích laboratořích) byly použity pro srovnání plazmových hodnot získaných metodou FastPack® IP TSH a FastPack® TSH a plazmových hodnot získaných metodou Abbott IMx Ultrasensitive hTSH II. Hodnoty byly posouzeny na shodu pomocí lineární regrese analýzy s asociovaným korelačním koeficientem.

n	Rozsah pozorování (µIU/ml)	Průsečík (µIU/ml)	Sklon	R
96	0,03 až 87,99	0,83	1,03	0,97

FastPack® sérum vs. FastPack® plazma

Od 74 zdravých dobrovolníků mužského i ženského pohlaví ve věku 18 až 60 let byly provedeny odběry a tyto vzorky byly souběžně zpracovány na heparinové plazmové a sérové vzorky. Hodnoty byly posouzeny na shodu pomocí lineární regrese analýzy s asociovaným korelačním koeficientem.

n	Rozsah pozorování (µIU/ml)	Průsečík (µIU/ml)	Sklon	R
74	0,22 – 92,75 (heparinové plazmové)			
74	0,24 – 90,00 (sérové)	0,01	0,97	1,00



RUŠICÍ LÁTKY

K sérovým vzorkům obsahujícím známá množství TSH byly přidány rušící látky. Hodnota získaná pro každé sérové nebo plazmové vzorky s každou rušící látkou byla srovnána s hodnotou získanou pro sérum nebo plazmu bez rušící látky. Pro tuto studii bylo stanoveno kritérium pro přijetí bylo $\pm 20\%$ hodnoty pro sérové nebo plazmové vzorky bez přidané rušící látky. Tyto sloučeniny nevykazují rušení na indikovaných úrovních.

Koncentrace TSH v sérových vzorcích (μIU/ml)	Rušící látky	Koncentrace, rušící látky	% rušení
1,0, 5,0, 20,0	Bilirubin	40 mg/dl	< 10
1,0, 5,0, 20,0	Hemoglobin	1 000 mg/dl	< 20
1,0, 5,0, 20,0	Triglyceridy	1 000 mg/dl	< 5

Koncentrace TSH v plazmových vzorcích (μIU/ml)	Rušící látky	Koncentrace, rušící látky	% rušení
1,85	Bilirubin	40 mg/dl	< 5
1,63	Hemoglobin	1 000 mg/dl	< 5
1,63	Triglyceridy	1 000 mg/dl	< 10

MEZ SLEPÉHO VZORKU (LOB), MEZ DETEKCE (LOD) A MEZ KVANTIFIKACE (LOQ)

Mez slepého vzorku (LOB, nejvyšší měření, které může být pravděpodobně zjištěno pro slepý vzorek), mez detekce (LOD, nejmenší množství analytu ve vzorku, které lze zjistit s mírou chyb typu I a II stanovené na 5 %) a mez kvantifikace (LOQ, nejmenší množství analytu ve vzorku, které lze spolehlivě zjistit a pro které celková chyba splňuje předem stanovený požadavek správnosti) byly určeny pro sérum a plazmu podle CLSI EP17-A. V této studii byla mez slepého vzorku pro sérové a plazmové vzorky určena z 60 replikovaných stanovení vzorku s odstraněnými fibriny a lipidy a dvakrát filtrovaného přes aktivní uhlí. Surové signály RLU z analýz byly konvertovány na zjevné μIU/ml na základě kalibrační křivky pro každou analýzu. Pro každý typ vzorku byla určena LOB jako neparametrický 95. percentil distribuce hodnot. Tato hodnota byla 0,016 μIU/ml TSH pro sérové vzorky a 0,019 μIU/ml TSH pro plazmové vzorky.

Pro sérové vzorky byla LOD odhadnuta na základě 60 replikovaných stanovení třech sérových vzorků s nízkou koncentrací. Na základě Gaussovy křivky byla LOD určena podle následující rovnice:

$$LOD = LOB + (c_{\beta} \times SD_S),$$

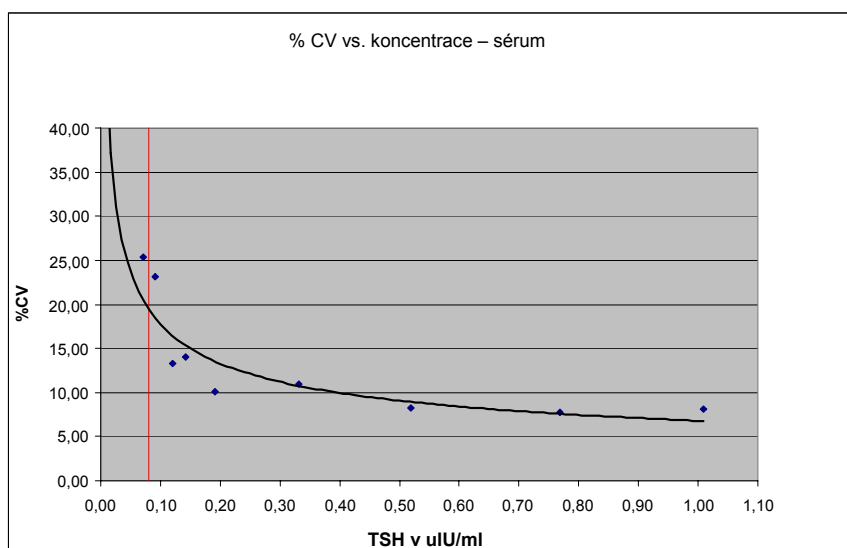
Kde $c_{\beta} = 1,645/(1-(1/(4 \times f)))$, kde f jsou stupně volnosti a SD_S je směrodatná odchylka pozorování. V této studii byla LOD určena na 0,11 $\mu\text{IU/ml}$ TSH.

Pro plazmové vzorky byla LOD odhadnuta na základě 60 replikovaných stanovení šesti plazmových vzorků s nízkou koncentrací. Na základě negaussova rozdělení byla LOD určena identifikací nejnižšího vzorku s hodnotami, které vykazaly <5 % přesah s hodnotami slepého vzorku. Tato koncentrace byla určena jako 0,08 $\mu\text{IU/ml}$ TSH.

Pro určení LOQ v séru a plazmě byly prospektivně definovaná kritéria pro přijetí pro správnost 80 - 120 % výtěžku cílové hodnoty vzorků s nízkou koncentrací a <20 % CV. V této studii splňoval sérový vzorek s přiřazenou hodnotou 0,127 $\mu\text{IU/ml}$ TSH kritéria pro přijetí. Pro plazmový vzorek splňovala kritéria pro přijetí přiřazená hodnota 0,129 $\mu\text{IU/ml}$ TSH.

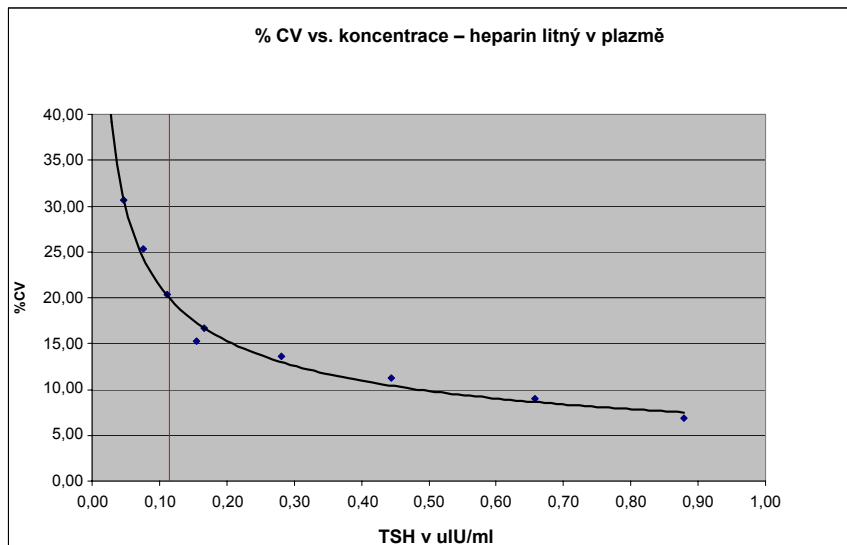
FUNKČNÍ CITLIVOST V SÉRU A HEPARINOVÉ PLAZMĚ

Funkční citlivost definovaná jako koncentrace v $\mu\text{IU/ml}$ TSH, při které analýza dosahuje CV 20 %, byla určena pro sérové vzorky a plazmové vzorky s heparinátem litným. Pro obě metody zahrnovalo zkoumání přípravu 9 vzorků ve specifikované matici v rozsahu ~0,05 až 1 $\mu\text{IU/ml}$ TSH, následované analýzou každého vzorku v 30 replikovaných stanoveních, (6 replikovaných stanovení/den v průběhu 5 dní zkoušení) s jednou šarží činidel FastPack® TSH. Střední směrodatná odchylka (SD) a % CV byly spočteny z replikovaných stanovení. Střední koncentrace TSH pro každý vzorek byla následně vynesena oproti % CV a tato data proložena exponenciální funkcí ve formě Ae^{kx} . Koncentrace, při které byla dosažena 20 % CV, byla identifikována na základě proložených dat. Následující graf znázorňuje vztah mezi střední koncentrací a % CV. Svislá příčka na grafu označuje bod, pro který je dosažena 20 % CV. Pro analýzu séra s FastPack® IP TSH a FastPack® TSH je tento bod 0,08 $\mu\text{IU/ml}$ TSH. Funkční citlivost FastPack® IP TSH a FastPack® TSH pro analýzu séra je tedy odhadnuta na 0,08 $\mu\text{IU/ml}$ TSH.



Funkční citlivost plazmového vzorku TSH s heparinátém litným

Následující graf znázorňuje vztah mezi střední koncentrací a % CV. Svislá příčka na grafu označuje bod, pro který je dosažena 20 % CV. Pro analýzu heparinové plazmy s FastPack® IP TSH a FastPack® TSH je tento bod 0,115 μ U/ml TSH. Funkční citlivost FastPack® IP TSH a FastPack® TSH pro analýzu heparinové plazmy je tedy odhadnuta na 0,115 μ U/ml TSH.



SPECIFICITA

Sérum

Byly připraveny tři zásobní roztoky sérových vzorků pro dosažení koncentrací ~ 1, 5 a 20 μ U/ml TSH. Každý vzorek byl rozdělen na čtyři alikvotní množství a tři z nich byly kontaminovány hCG, LH a FSH v koncentracích 200 000, 500 a 500 mIU/ml. Vzorky byly testovány společně s nekontaminovaným referenčním vzorkem v pěti replikacích každý na dvou přístrojích FastPack® za využití jedné šarže zkušebních karet. Data byla analyzována s ohledem na % rozdílů oproti referenčnímu vzorku bez obsahu kontaminujících látek. Pro tuto studii bylo předem stanoveno kritérium pro přijetí ± 20 % hodnoty referenčního nekontaminovaného vzorku. V žádném případě neovlivnily kontaminující látky výtěžek o více než 20 %.

Plazma

Plazma s odstraněným TSH byla kontaminována různou koncentrací hCG, FSH a LH pro určení, zda tyto materiály dávají pozitivní signál TSH při analýze. Bylo zjištěno, že křížová reaktivita protilátky použité ve FastPack® IP TSH a FastPack® TSH není pro hCG, LH a FSH testovaných v koncentracích 200 000, 500 respektive 500 mIU/ml detekovatelná.

ODKAZY

- ¹ Braverman, LE, Utigen, RD, Eds: Werner and Ingbar's The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text. 7th ed., Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996.
- ² Burtis, CA, Ashwood, ER, Eds: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed., New York, WB Saunders Company, p. 1492, 1999.
- ³ Larsen, PR: Thyroid-pituitary interaction. N. Engl. J. Med., 306:23-32, 1982.
- ⁴ Approved Standard – procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 5th Edition: H3-A5: 23(32), 2003, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
- ⁵ Approved guideline – procedures for the handling and processing of blood specimens, H18-A2; 19(21), 1999. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).
- ⁶ Schroff, RJ, Foon, KA, *et.al*: Human anti-mouse immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. Cancer Res, 45:879 – 885, 1985
- ⁷ Jackson, IM: Thyrotropin-releasing hormone. N. Engl. J. Med., 306: 145-155, 1982.
- ⁸ Pierce, JG: Subunits of Pituitary Thyrotropin. Their relationship to other glycoprotein hormones. Endocrinology, 89: 1331-1344, 1971.
- ⁹ Nicoloff JT, Spencer CA: The use and misuse of the sensitivity thyrotropin assays. J. Clin. Endocrinology, 71, 553 – 558, 1990.
- ¹⁰ Spencer CA: Thyroid profiling for the 1990's: free T4 estimate or sensitive TSH measurement. J. Clin Immunoassay, 12, 82 – 89, 1989.



Qualigen, Inc.
Carlsbad, CA 92011 USA
Technická podpora
+1 (760) 918-9165
+1 (877) 709-2169



MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Německo

