



УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной
службы по надзору в сфере
здравоохранения и социального
развития

Р.У. Хабриев

«10» 09 2004 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов количественного определения уровня
тиреотропного гормона для скрининга
гипотиреоза у новорожденных методом лантанидного
иммунофлуоресцентного анализа
(ТТГ-неоскрин)

Рекомендована к утверждению комиссией по наборам реагентов для
иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа
(протокол № 3 от "22" марта 2004 г.)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ТТГ-неоскрин предназначен для количественного определения уровня тиреотропного гормона (ТТГ) в сухих пятнах крови новорожденных при неонатальном скрининге гипотиреоза.

1.2. Первичный гипотиреоз - врожденное эндокринное заболевание, связанное с нарушением функционирования щитовидной железы, встречается с частотой 1:3500 - 1:4000 родов.

Инструкция разработана: начальником ОТК д.б.н. В.Г. Помеловой, главным технологом к.б.н. Быченковой Т.А. - сотрудниками ЗАО «Иммуноскрин»; д.м.н., проф. И.П.Ларичевой - сотрудником Московского областного НИИ акушерства и гинекологии.

Тиротропин человека (ТТГ) секретируется передней долей гипофиза и является гликопротеином с молекулярной массой около 30 000 дальтон, состоящим из двух субъединиц - альфа и бета. ТТГ стимулирует синтез и секрецию гормонов щитовидной железы - тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). Находящиеся в кровообращении свободные фракции T_4 и T_3 в свою очередь регулируют секрецию ТТГ. При первичном гипотиреозе щитовидная железа секретирует недостаточное количество гормонов и, следовательно, уровень ТТГ повышен.

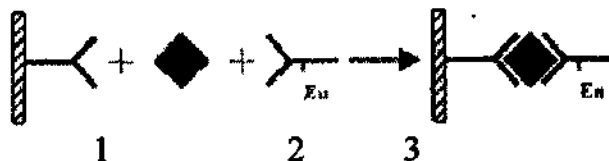
1.3. Выявление новорожденных с первичным врожденным гипотиреозом основано на использовании величины пороговой концентрации ТТГ. Концентрация ТТГ, превышающая пороговое значение, указывает на патологию, требующую дополнительного лабораторного обследования. Для уточнения диагноза необходимо определить концентрацию ТТГ и тироксина (T_4) в сыворотке крови.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа 410 неизвестных, 60 калибровочных и 10 контрольных проб в дубликатах, всего 960 определений.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

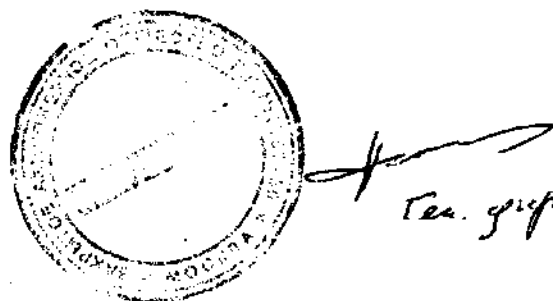
Набор ТТГ-неоскрин основан на принципе иммунофлуоресценции, включающей использование сэндвича высокоспецифичных моноклональных мышиных антител против двух различных антигенных детерминант на молекуле ТТГ. Анализ проводится в одну стадию с образованием иммунного сэндвич комплекса.

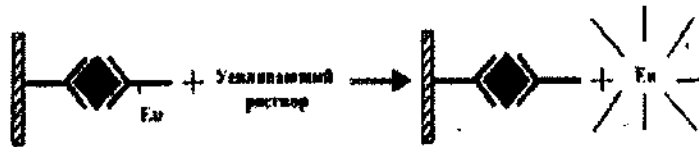
ТТГ элюируется из кровяных дисков, приготовленных из пятен крови новорожденных, калибровочных и контрольных проб, и одновременно образует сэндвич между моноклональными антителами, сорбированными на поверхности полистирольных стрипов, и вторыми моноклональными антителами, конъюгированными с ионами европия.



1. Покрытые анти-ТТГ стрипы
2. ТТГ в неизвестных, калибровочных и контрольных пробах
3. Конъюгат моноклональных антител с хелатом европия

После инкубации диски удаляются, а несвязавшиеся компоненты пробы и избыток конъюгата отмываются. Затем добавляют усиливающий раствор, позволяющий диссоциировать ионы европия из иммунного комплекса с последующим образованием сильно флуоресцирующих хелатов с компонентами раствора.





Интенсивность флуоресценции ионов европия прямо пропорциональна количеству ТТГ в анализируемом образце. Результаты анализа регистрируются с помощью флуориметра с временным разрешением при длине волны 615 нм.

3. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят следующие компоненты:

- концентрат промывного раствора (натрия хлорид, 22,5%; твин-40, 0,25%) – 1 флакон (250 мл);
- буфер [трис-(гидроксиметил)-аминометан, 12,1 мг/мл; диэтиленetriамин - пентауксусная кислота, 0,008 мг/мл; твин 40, 0,01%; соляная кислота до pH 7,75; альбумин бычий сывороточный, 0,5%; натрия хлорид, 0,9%; натрия азид, 0,05%] – 1 флакон (250 мл);
- раствор усиливающий – 1 флакон (250 мл);
- конъюгат (мышинные моноклональные анти-ТТГ антитела, меченные ионом европия; натрия азид, 0,05%; альбумин бычий сывороточный, 0,5%) - 1 флакон (2,5 мл);
- пробы калибровочные А-В-С-Д-Е-Ф: высушенные на фильтровальной бумаге пятна крови, содержащие известные концентрации ТТГ: 0 мкМЕ/мл крови, 10 мкМЕ/мл крови, 25 мкМЕ/мл крови, 50 мкМЕ/мл крови, 100 мкМЕ/мл крови, 250 мкМЕ/мл крови, откалиброваны относительно Международного стандарта ТТГ человека 2nd IRP 80/558; концентрации ТТГ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные концентрации указаны на этикетке пакета – 1 пакет (по 15 пятен каждой концентрации);
- пробы контрольные с низким и высоким содержанием ТТГ: высушенные на фильтровальной бумаге пятна крови - 1 пакет (по 15 пятен каждой концентрации);
- планшет - анти-ТТГ, 96 луночный (8 стрипов по 12 лунок) с сорбированными на поверхности лунок моноклональными анти-ТТГ антителами – 10 шт.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

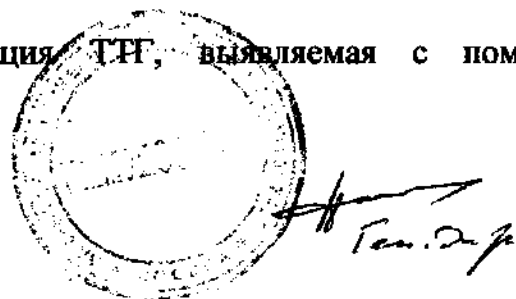
4.1. Набор обеспечивает выявление ТТГ в сухом пятне крови диаметром 3,2 мм.

4.2. Диапазон определяемых концентраций ТТГ составляет от 10 до 250 мкМЕ/мл.

Набор позволяет определять концентрацию тиротропина в диапазоне концентраций от 2 до 10 мкМЕ/мл крови.

4.3. Чувствительность.

Минимальная концентрация ТТГ, выявляемая с помощью набора, составляет не более 2 мкМЕ/мл.



4.4. Воспроизводимость результатов.

Коэффициент вариации результатов измерения концентрации ТТГ в образцах - не более 15%.

4.5. Специфичность. Перекрестная реакция обоих моноклональных антител к β -субъединице ТТГ с хорионическим гонадотропином, лютеинизирующим и фолликулостимулирующим гормонами человека не превышает 0,2 %.

4.6. Интенсивность флуоресценции лунок с калибровочной пробой А (0 мкМЕ/мл) должна быть не больше 2000 имп/с.

4.7. В России рекомендуемый пороговый уровень нормальной концентрации ТТГ в крови новорожденного (cut-off) - 20 мкМЕ/мл крови (что эквивалентно 44 мкМЕ/мл в сыворотке крови со значением гематокрита 50-55%). Это значение cut-off пригодно для оценки уровня ТТГ в сухих пятнах крови новорожденных на 3-5 день после рождения (при преждевременных родах на 7-14 день жизни).

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5.3. Меры предосторожности - соблюдение "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемиологического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.).

5.4. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.5. Конъюгат и буфер содержат азид натрия. При попадании их на кожу и слизистые необходимо промыть пораженные участки большим количеством проточной воды.

5.6. Использованные планшеты и наконечники для отбора конъюгата рекомендуется сразу после окончания работы поместить в полиэтиленовый пакет и сбросить в мусоросборник.

5.7. Пролитый при исследовании материал следует засыпать поглощающим веществом (типа полиэтиленгликоля) и обработать дезинфектантом (3% перекисью водорода). Необходимо тщательно собрать все пролитое вещество и провести обработку поверхности свежей порцией дезинфектанта. Предметы с острыми краями (стекло или осколки каких-либо предметов), а также весь материал, использованный для удаления пролитых реагентов, следует поместить в контейнер как потенциально инфицированный.



Ген. дир.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Флуориметр с временным разрешением.
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с фиксированным или переменным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 20, 100, 200, 1000 мкл;
- встряхиватель (шейкер);
- устройство промывающее;
- устройство для удаления дисков из лунок;
- устройство для приготовления дисков из пятна (панчер);
- устройство (диспенсер) для внесения усиливающего раствора;
- холодильник бытовой;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная;
- колба мерная вместимостью 1000 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Кровь берется обычным способом, стерильным скарификатором из пальца или пятки, падающей каплей, не касаясь бланка. Важно, чтобы пятно крови на бумаге было образовано пропитыванием от одной капли, а пропитывание бумаги было достаточным (вид пятна одинаков с обеих сторон). Полученные пятна крови высушивают в течение 2-3 часов в горизонтальном положении при комнатной температуре (+18 - 25°C), избегая попадания прямых солнечных лучей.

Размер наскавозь пропитанного кровью диска должен быть в диаметре не менее 12 мм. Таких дисков (пятен) должно быть не меньше трех.

Образцы крови, наносимые на фильтровальную бумагу, не должны содержать ЭДТА во избежание искажения результатов анализа.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

8.1. Извлечь набор из холодильника и выдержать реагенты при комнатной температуре (+18-25°C) в течение времени не менее 30 минут. Перед использованием реагенты тщательно перемешать легким встряхиванием.

8.2. Приготовление рабочего промывного раствора.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл внести 40 мл концентрата промывного раствора, добавить дистиллированной воды до метки и тщательно перемешать; этого количества достаточно для полного цикла отмычки 2 планшетов. Приготовленный раствор можно хранить не более 7 дней при температуре +2-8° С.

8.3. Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Необходимое количество конъюгата внести во флакон с соответствующим количеством буфера анализа, тщательно перемешать.

Конъюгат разводить согласно схеме:



Ген. дир.

Схема разведения конъюгата

Число планшетов	Конъюгат (мкл)	Буфер (мл)
1	220	22
2	420	42
3	620	62
4	820	82
5	1020	102
6	1220	122
7	1420	142
8	1620	162
9	1820	182
10	2200	220

Раствор конъюгата необходимо использовать в течение 1 часа после приготовления, хранению не подлежит.

8.4. Подготовка планшетов.

Извлечь планшеты из упаковки, оставить в рамке необходимое число стрипов.

Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить в полиэтиленовый пакет и хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца.

8.5. Составить схему расположения проб, так как это указано ниже:

Расположение проб на 12-луночных стрипах:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	КП _А	КП _А	КП _В	КП _В	КП _С	КП _С	КП _Д	КП _Д	КП _Е	КП _Е	КП _Ф	КП _Ф
В	КСП ₁	КСП ₁	КСП ₂	КСП ₂	НП ₁	НП ₁	НП ₂	НП ₂	НП ₃	НП ₃	и т.д.	

КП_А - КП_Ф - лунки для калибровочных проб,

КСП - лунки для контрольных проб,

НП - лунки для неизвестных проб.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Калибровочные пробы А - Ф, контрольные пробы с низким и высоким содержанием ТТГ и анализируемые образцы сухих пятен крови внести с помощью пинцера в лунки планшета по 1 диску в лунку.

9.2. Во все лунки внести по 200 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 8.3).

Первый объем конъюгата следует отбросить. При внесении раствора конъюгата нельзя касаться наконечником пипетки края лунок и поверхности жидкости.



Г. А. Д. П.

9.3. Планшет встряхивать на шейкере в режиме "быстро" (скорость вращения 900-1200 об./мин) при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 10 минут.

9.4. Планшет закрыть крышкой или заклеивающим листочком и инкубировать в покое в течение 18 часов при температуре +2-8°C.

9.5. Поместить планшет на встряхиватель и инкубировать в течение 1 часа при комнатной температуре в режиме "медленно" (скорость вращения 600-800 об./мин).

9.6. После окончания инкубации удалить диски из лунок с помощью устройства для удаления дисков.

9.7. Провести 6-кратное промывание стрипов рабочим промывным раствором (см п. 8.2) с помощью промывающего устройства в соответствии с программой, прилагаемой к промывающему устройству.

При промывании стрипов все лунки должны заполняться рабочим промывным раствором полностью. В конце каждого промывания буфер должен полностью удаляться из лунок. Оставшуюся в лунках планшета жидкость следует удалить, постучав перевернутым планшетом о ровную поверхность, покрытую чистой фильтровальной бумагой.

9.8. Во все лунки внести по 200 мкл усиливающего раствора только с помощью специального диспенсера для внесения усиливающего раствора. Перед внесением усиливающего раствора отбросить 10-15 вносимых объемов. При внесении усиливающего раствора не касаться краев лунок или их содержимого.

9.9. Суммарное время внесения калибровочных, контрольных и неизвестных проб и внесения растворов реагентов не должно превышать 30 минут для одного планшета.

9.10. Инкубировать планшет в течение 10 минут при встряхивании в режиме "медленно" и дополнительно в течение 5-10 минут без встряхивания при комнатной температуре.

9.11. Измерить интенсивность флуоресценции на флуориметре с временным разрешением при длине волны 615 нм в течение 1 часа после окончания времени инкубации (см п. 9.10).

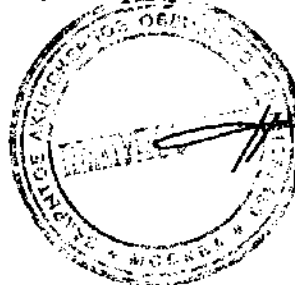
Краткая схема анализа приведена на стр. 8.

10. РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

10.1. Содержание ТТГ в исследуемых пробах определяют при сопоставлении с интенсивностью флуоресценции калибровочных проб по калибровочному графику зависимости интенсивности флуоресценции в имп/с от концентрации ТТГ в мкМЕ/мл, построенному с использованием программных средств флуориметра.

10.2. Типичный калибровочный график приведен на рис. 9.

10.3. Правильность проведения анализа проверяется по результатам определения ТТГ в контрольных пробах. Если полученные значения находятся в пределах, указанных в паспорте и на этикетке, то результат анализа следует считать правильным.

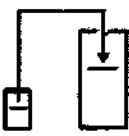


К.С. Давыдов

10.4. Значения ТТГ указаны в расчете на единицу объема цельной крови. Для сравнения результатов относительно значений сыворотки следует произвести следующий пересчет:

ТТГ мкМЕ/мл сыворотки = 2,2 ТТГ мкМЕ/мл крови.

СХЕМА АНАЛИЗА

Приготовление рабочего раствора конъюгата		Схема разведения конъюгата		
		Число планшетов	Конъюгат (мкл)	Буфер (мл)
		1	220	22
		2	420	42
		3	620	62
		4	820	82
		5	1020	102
		6	1220	122
		7	1420	142
		8	1620	162
		9	1820	182
		10	2200	220
Внесение калибровочных, контрольных и неизвестных проб		1 диск (3,2 мм)		
Добавление рабочего раствора конъюгата		200 мкл		
Инкубация		10 минут при сильном встряхивании (скорость вращения 900-1200 об./мин) + 18 часов в покое при +2 - 8°C + 1 час при слабом встряхивании (скорость вращения 600-800 об./мин) и комнатной температуре		
Удаление дисков и промывание		Шестикратное		
Внесение усиливающего раствора		200 мкл, инкубация 10 минут при слабом встряхивании (скорость вращения 600-800 об./мин) + 5 минут в покое		
Измерение интенсивности флуоресценции		Флуориметр с временным разрешением		



Handwritten signature and date: 10.12.18

Флуоресценция,
тыс. имп./с

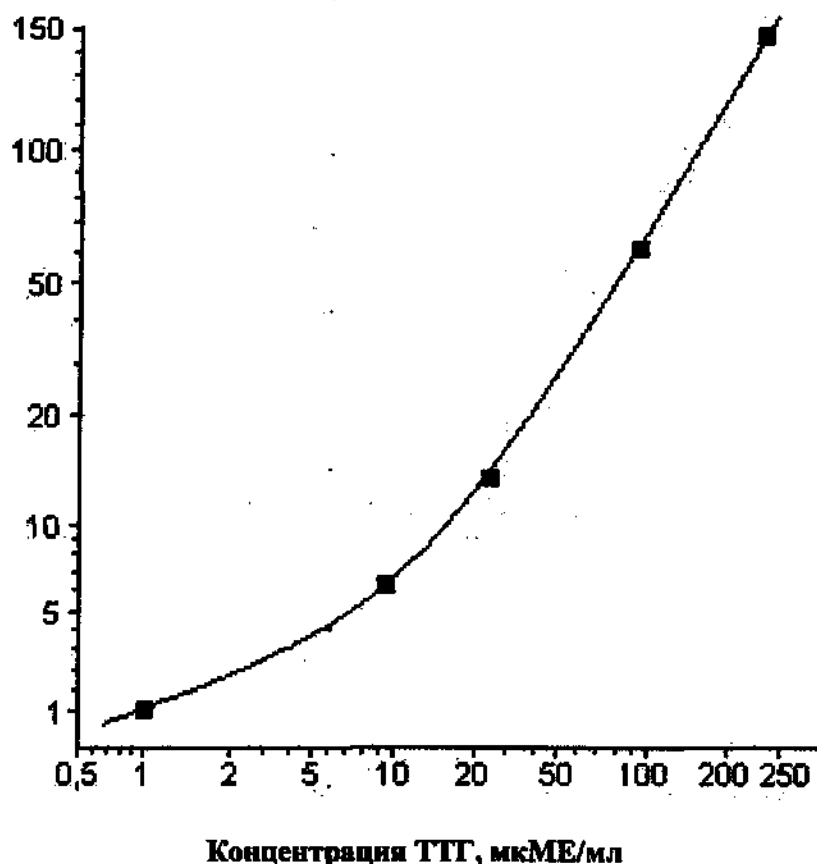


Рис. Образец калибровочного графика

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаружение новорожденных с первичным неонатальным гипотиреозом основано на использовании величины предварительно принятой пороговой концентрации ТТГ (cut-off), которая устанавливается эмпирически, зная разброс нормальных значений в популяции. Общепринятым для скрининговых медико-генетических центров России является использование в качестве пороговой концентрации ТТГ 20 мкМЕ/мл крови (эквивалентно 44 мкМЕ/мл сыворотки при гематокрите 50-55%). Концентрация ТТГ, превышающая пороговое значение, указывает на патологию, требующую дополнительного лабораторного тестирования. Все образцы с концентрацией выше 20 мкМЕ/мл должны быть проверены повторно для исключения ложноположительных результатов.

В случае повторного обнаружения в том же образце крови концентрации ТТГ выше пороговой скрининг-лаборатория уведомляет поликлинику по месту



Gen. 24/7

проживания новорожденного о необходимости повторного взятия крови для количественного определения уровня ТТГ.

При концентрации ТТГ от 20 до 100 мкМЕ/мл забор крови производится на бланк, исследованию подвергаются высушенные пятна крови.

При концентрации ТТГ более 100 мкМЕ/мл следует получить сыворотку крови для параллельного определения в ней ТТГ, тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2 - 8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 3 суток.

12.2. Срок годности набора - 12 месяцев.

12.3. Неиспользованные стрипы можно хранить в полиэтиленовом пакете при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца.

12.4. Калибровочные пробы и контрольные пробы после вскрытия пакета можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца.

12.5. Конъюгат после вскрытия флакона можно хранить при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение срока годности набора.

12.6. Рабочий раствор конъюгата после разведения хранению не подлежит.

12.7. Усиливающий раствор после вскрытия флакона можно хранить в темном месте при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение срока годности набора.

12.8. Буфер анализа и концентрат промывного раствора после вскрытия флаконов можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение срока годности набора.

12.9. Рабочий промывной раствор можно хранить при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ не более 7 дней.

12.10. Не следует использовать реагенты из различных серий наборов.

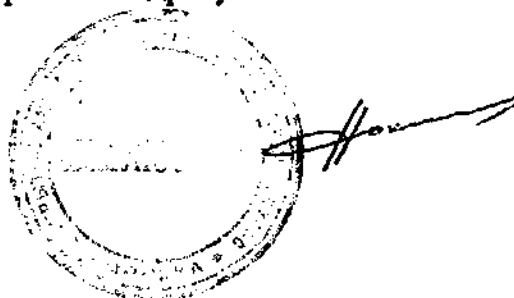
12.11. Не следует держать реагенты на ярком свете во время инкубации и хранения.

12.12. Для отбора и добавления реагентов рекомендуется использовать полуавтоматические одноканальные пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимости результатов пипетирования.

12.13. Следует избегать загрязнения реагентов ионами металлов в связи с возможностью получения ложных результатов.

12.14. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора ТТГ-неоскрин, следует обращаться в ЗАО «Иммуноскрин» по адресу:



125424, г. Москва, Волоколамское шоссе, д.75/1; тел.: (095)490-57-04
и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ
ЭСМП» ФС НЗСР по адресу:
117246, г. Москва, Научный проезд, д.14а; тел.: (095) 120-6095; 120-6096.

Начальник отдела

технического контроля ЗАО «Иммуноскрин», д.б.н.

В.Г.Помелова

Главный технолог ЗАО «Иммуноскрин», к.б.н.

Т.А.Быченкова

Старший научный сотрудник МОНИИАГ
д.м.н., проф.

И.П.Ларичева

