

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	2
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	2
4. СКЛАД НАБОРУ	3
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	4
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ	4
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	4
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	5
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	6
10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	7

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	8
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	9
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
4. СОСТАВ НАБОРА	10
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	11
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	11
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	11
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	12
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	13
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	14

CONTENT

1. INTENDED USE	15
2. SUMMARY AND EXPLANATION	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	16
5. KIT COMPONENTS	17
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	18
7. TEST PROCEDURE	18
8. QUALITY CONTROL	19
9. CALCULATION OF RESULTS	20
10. EXPECTED VALUES	20
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	20

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНУ В СУХИХ ПЛЯМАХ КРОВІ НЕМОВЛЯТ «ТТГ-НЕО-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «ТТГ-НЕО-ІФА», призначений для кількісного визначення концентрації тиреотропного гормону в сухих плямах крові немовлят методом твердофазного імуноферментного аналізу при неонатальному скринінгу гіпотиріозу.

1.2. Тиреотропний гормон (ТТГ) – глікопротеїн з молекулярною масою близько 30 кДа, секретується передньою часткою гіпофіза. Молекула ТТГ складається із двох нековалентно зв'язаних поліпептидних ланцюгів: альфа- і бета-суб'єдиниці. Специфічність і біологічну активність гормону визначає його бета-суб'єдиниця.

1.3. Первинний гіпотиріоз – вроджене ендокринне захворювання, пов'язане з порушенням функціонування щитовидної залози, зустрічається із частотою 1:3500–1:4000 пологів.

Вільні фракції Т4 і Т3, що перебувають у кровообігу, у свою чергу регулюють секрецію ТТГ. При первинному гіпотиріозі щитовидна залоза секретує недостатню кількість гормонів і, отже, рівень ТТГ підвищений.

1.4. Виявлення немовлят з первинним вродженим гіпотиріозом засноване на використанні величини граничної концентрації ТТГ. Концентрація ТТГ, що перевищує граничне значення, вказує на патологію, що вимагає додаткового лабораторного обстеження. Для уточнення діагнозу необхідно визначити концентрацію ТТГ і тироксину (Т4) у сироватці крові.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення тиреотропного гормону засноване на використанні «сендвіч»-варіанта твердофазного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі моноклональні антитіла до бета-ланцюга ТТГ людини. У лунках планшета, при додаванні диска з досліджуваним зразком, відбувається елюція ТТГ і зв'язування з антитілами на твердій фазі. Комплекс, що утворився, виявляють за допомогою кон'югата іншого епітопа мишачих моноклональних антитіл до бета-ланцюга ТТГ людини з пероксидазою хрину. У результаті утворюється пов'язаний із пластиком «сендвіч», що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидина (ТМБ) відбувається фарбування розчинів у лунках. Інтенсивність фарбування прямо пропорційна концентрації тиреотропного гормону в досліджуваному зразку. Концентрацію тиреотропного гормону в досліджуваних зразках визначають за графіком залежності оптичної щільності від вмісту тиреотропного гормону в каліброваних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність. Перехресна реакція мишачих моноклональних антитіл до бета-ланцюга ТТГ з іншими аналітами наведена в таблиці:

Аналіт	Перехресна реакція, %
ХГ	<0.1
ЛГ	<0.1
ФСГ	<0.1

3.2. Відтворюваність. Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту ТТГ у тому самому зразку сухих плям крові немовлят з використанням Набору «ТТГ-НЕО-ІФА» не перевищує 15%.

3.3. Чутливість. Мінімальна вірогідно обумовлена Набором «ТТГ-НЕО-ІФА» концентрація ТТГ у сухих плямах крові немовлят не перевищує 3 мКМЕ/мл крові.

4. СКЛАД НАБОРУ

Код юмпонента	Символ	Найменування	Кількість	Од.	Опис
1	P201NZ	Планшет 96-луночковий полістироловий, стрипирований, готовий до використання	1	шт.	-
2	C201NZ	Калібрувальні проби – висушені на фільтрувальному папері плями на основі цільної крові людини, обумовлені відомими кількостями тиреотропного гормону – 0; 10; 25; 50; 100; 250 мкМЕ/мл крові, готові до використання (калібрована проба 0 мкМЕ/мл крові – мл, інші – по 2 мл кожної), атестовані по Другому міжнародному референсному препарату ТТГ людини WHO 80/558 Концентрація ТТГ в каліброваних пробах може відрізнятися від вказаних величин, точні концентрації вказані на етикетці пакету.	6	шт.	-
3	T201NZ	Кон'югат, готовий до використання (11 мл)	1	шт.	Прозора рідина червоного кольору
4	SP201N	Буфер для розведення зразків, готовий до використання (21 мл)	1	шт.	Прозора рідина синього кольору
5	R055Z	Розчин субстрату тетраметилбензидина (ТМБ), готовий до використання (11 мл)	1	шт.	Прозора безбарвна рідина
6	S008Z	Концентрат відмивочного розчину, 21х-кратний (44мл)	1	шт.	Прозора безбарвна рідина
7	R050Z	Стоп-реагент, готовий до використання (11 мл)	1	шт.	Прозора безбарвна рідина
8	N003	Папір для заклеювання планшета	1	шт.	-
9	K201NI	Інструкція з використання Набору реагентів «ТТГ-НЕО-ІФА»	2	шт.	-
10	K201NQ	Паспорт контролю якості Набору реагентів «ТТГ-НЕО-ІФА»	1	шт.	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Потенційний ризик застосування Набору - клас 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5,0% розчин сірчаної кислоти), у використовуваних концентраціях є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має дратівну дію. Уникати розбризкування й потрапляння на шкіру й слизові. При потрапленні на шкіру й слизові уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.3. При роботі з Набором слід дотримуватись «Правил устрою, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму й особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР» (Москва, 1981 р.).

5.4. При роботі з Набором слід надягати одноразові гумові або пластикові рукавички, тому що зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати й передавати ВІЛ, вірус гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну щільність умісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- орбітальний шейкер (струсувач) для мікропланшет, швидкість 600–800 об/хв;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати обсяги в діапазоні 25–250 мкл;
- циліндр мірний місткістю 500 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний;
- пристрій для готування дисків із плями (панчер);

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору й досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі (+18...+25 °С) не менш 30 хв;

7.2. Підготовка планшета.

Розкрити пакет із планшетом і встановити на рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися невикористаними, щоб запобігти впливу на них вологи, ретельно заклеїти папером для заклеювання планшета й зберігати при температурі +2...+8 °С протягом усього строку придатності Набору.

7.3. Готування відмивочного розчину.

У випадку дробового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату відмивочного розчину й розвести дистильованою водою в 21 раз (1 мол концентрату відмивочного розчину + 20 мол дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «ТТГ-НЕО-ІФА» повинен зберігатися в упаковці підприємства-виробника при температурі $+2...+8$ °С протягом усього строку придатності, зазначеного на упаковці Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до $+25$ °С не більш 5 діб. Не допускається заморожування цілого набору.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в дублікатах 40 досліджуваних зразків, 6 каліброваних проб (усього 96 визначень).

8.3. У випадку дробового використання Набору компоненти слід зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти папером для заклеювання планшета й зберігати при температурі $+2...+8$ °С протягом усього строку придатності Набору;
- буфер для розведення зразків, кон'югат, субстрат, стоп-реагент після розкриття флаконів слід зберігати при температурі $+2...+8$ °С протягом усього строку придатності Набору;
- калібрувальні після розкриття упаковки слід зберігати при температурі $+2...+8$ °С не більш 1 місяця;
- концентрат відмивочного розчину що залишився невикористаним, слід зберігати при температурі $+2...+8$ °С протягом усього строку придатності Набору;
- приготовлений відмивочний розчин слід зберігати при кімнатній температурі ($+18...+25$ °С) не більш 5 діб або при температурі $+2...+8$ °С не більш 30 діб;

Примітка. Після використання реагенту негайно закривайте кришку флакона. Закривайте кожний флакон своєю кришкою.

8.4. Кров береться звичайним способом, стерильним скарифікатором з пальця або п'яти краплею, що падає, не торкаючись бланка. Важливо, щоб пляма крові на папері було утворено просочуванням від однієї краплі, а просочування паперу було достатнім (вид плями -однакова по обидва боки). Отримані плями крові висушують протягом 2–3 годин у горизонтальному положенні при кімнатній температурі ($+18...+ 25$ °С), уникаючи потрапляння прямих сонячних променів.

Розмір наскрізь просоченого кров'ю диска повинен бути в діаметрі не менш 12 мм. Таких дисків (плям) повинне бути не менше трьох.

Зразки крові, нанесені на фільтрувальний папір, не повинні містити ЕДТА щоб уникнути викривлення результатів аналізу.

8.5. При використанні Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного незалежного визначення необхідна побудова нового каліброваного графіка. Крім цього, рекомендується визначення концентрації тиреотропного гормону в контрольній сироватці.

8.6. Для одержання надійних результатів необхідно суворе дотримання Інструкції із застосування Набору.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛИЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – дослідних зразків в 2 повторях та 16 лунок для каліброваних проб.
2	Внести у всі лунки планшета по 200 мкл Буфера для розведення зразків.
3	За допомогою панчера із плям крові з каліброваними та дослідними пробами вибити диски діаметром біля 3,2 мм. УВАЖНО: вибиті диски повинні бути повністю просочені кров'ю по обидва боки, а якщо ні, то будуть отримані помилкові результати.
4	Внесіть у дублікатах по 1 дискові кожної каліброваної проби. В інші лунки внесіть у дублікатах по 1 дискові досліджуваних зразків.
5	Акуратно перемишайте вміст планшета круговими рухами по горизонтальній поверхні, заклейте планшет папером для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом ночі (12–18 годин) при температурі +18...+25 °C і постійним струмуванні зі швидкістю 600 об/хв
6	По закінченню інкубації вилучите вміст лунки аспірацією (наприклад, за допомогою водоструминного насоса) або декантуванням і відмійте лунки 5 раз. При кожному відміванні додайте в усі лунки по 250 мкл відмивочного розчину (див. п. 7.3), струсніть планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні з наступною аспірацією або декантуванням. Затримка при відміванні (замочування лунки) не потрібно. При кожному декантуванні необхідно ретельно видаляти залишки рідини з лунки.
7	Внесіть у всі лунки по 100 мкл коньюгата.
8	Заклейте планшет папером для заклеювання планшета та інкубуйте його на протязі 60 хвилин при температурі +18...+25°C та постійному струмуванні зі швидкістю 600 об/хв
9	По закінченню інкубації вилучите вміст лунки і відмійте лунки 5 раз.
10	Внесіть у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидина. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидина в лунки необхідно зробити протягом 2–3 хв. Інкубуйте планшет у темряві при кімнатній температурі (+18...+25°C) протягом 10–20 хвилин залежно від ступеня розвитку синього забарлювання.
11	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю й у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагенту, при цьому вміст лунки забарлюється в яскраво-жовтий колір.
12	Виміряйте величину оптичної щільності (ОП) вмісту лунки планшета на фотометрі вертикального сканування при довжині хвилі 450 нм. Вимір ОП вмісту лунки планшета необхідно зробити протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра вставляйте по каліброваній пробі С1.
13	Побудуйте в лінійних координатах калібрований графік: вісь абсцис (x) – концентрація ТТГ у каліброваних пробах (мкМЕ/мл крові), вісь ординат (y) – оптична щільність каліброваних проб (ОП 450 нм). Для алгоритму обрахування (апроксимації) каліброваного графіка використовуйте інтервальний (шматочно-лінійний), «Від крапки до крапки» метод.
14	Визначити за графіком зміст ТТГ у досліджуваних зразках.

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Виявлення немовлят з первинним неонатальним гіпотиріозом засноване на використанні величини попередньо прийнятої граничної концентрації ТТГ (cut-off), яка встановлюється емпірично, знаючи розкид нормальних значень у популяції. Загальноприйнятим для скринінгових медико-генетичних центрів Росії є використання як гранична концентрація ТТГ 20 мкМЕ/мл крові (еквівалентно 44 мкМЕ/мл сироватки при гематокриті 50–55%). Концентрація ТТГ, що перевищує граничне значення, вказує на патологію, що вимагає додаткового лабораторного тестування. Всі зразки з концентрацією вище 20 мкМЕ/мл повинні бути перевірені повторно для виключення хибно позитивних результатів. У випадку повторного виявлення в тому ж зразку крові концентрації ТТГ вище граничної скринінг- лабораторія повідомляє поліклініку за місцем проживання немовляти про необхідність повторного взяття крові для кількісного визначення рівня ТТГ. При концентрації ТТГ від 20 до 100 мкМЕ/мл забір крові проводиться на бланк, дослідженню піддають висушені плями крові. При концентрації ТТГ більш 100 мкМЕ/мл слід одержати сироватку крові для паралельного визначення в ній ТТГ, тироксину (Т4) і трийодтироніна (Т3). Разом з тим, відповідно до правил GLP (Гарної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна сама визначити параметри норми, характерні для обстежуваної популяції.

Примітка. Значення ТТГ зазначені в розрахунку на одиниці об'єму цільної крові. Для порівняння результатів щодо значень сироватки слід зробити наступне перерахування: ТТГ мкМЕ/мл сироватки = 2,2 ТТГ мкМЕ/мл крові.

З питань, якості Набору «ТТГ-НЕО-ІФА»,
слід звертатись в ТОВ «ХЕМА» за адресою:
ТОВ «Хема» 03022 Київ, а/с 101
Тел +38 (044) 521-3-521
e-mail: info@xema.com.ua
Internet: www.xema.com.ua

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ «ТТГ-НЕО-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТТГ-НЕО-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации тиреотропного гормона в сухих пятнах крови новорожденных методом твердофазного иммуноферментного анализа при неонатальном скрининге гипотиреоза.

1.2. Тиреотропный гормон (ТТГ) – гликопротеин с молекулярной массой около 30 кДа, секретируется передней долей гипофиза. Молекула ТТГ состоит из двух нековалентно связанных полипептидных цепей: альфа- и бета-субъединицы. Специфичность и биологическую активность гормона определяет его бета-субъединица.

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

Находящиеся в кровообращении свободные фракции Т4 и Т3 в свою очередь регулируют секрецию ТТГ. При первичном гипотиреозе щитовидная железа секретирует недостаточное количество гормонов и, следовательно, уровень ТТГ повышен.

1.4. 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 (Т4) в сыворотке крови.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение тиреотропного гормона основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к бета-цепи ТТГ человека. В лунках планшета, при добавлении диска с исследуемым образцом, происходит элюция ТТГ и связывание с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата другого эпитопа мышиных моноклональных антител к бета-цепи ТТГ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации тиреотропного гормона в исследуемом образце. Концентрацию тиреотропного гормона в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания тиреотропного гормона в калибровочных пробах

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к бета-цепи ТТГ с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
ХГ	<0.1
ЛГ	<0.1
ФСГ	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания ТТГ в одном и том же образце сухих пятен крови новорожденных с использованием Набора «ТТГ-НЕО-ИФА» не превышает 15%.

3.3. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ТТГ-НЕО-ИФА» концентрация ТТГ в сухих пятнах крови новорожденных не превышает 3 мкМЕ/мл крови.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P201NZ	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C201NZ	Калибровочные пробы – высушенные на фильтровальной бумаге пятна на основе цельной крови человека, содержащие известные количества тиреотропного гормона – 0; 10; 25; 50; 100; 250 мкМЕ/мл крови, готовые к использованию (по 2 шт каждая), аттестованные по Второму международному референсному препарату ТТГ человека WHO 80/558 Концентрации ТТГ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные концентрации указаны на этикетке пакета.	6	шт.	-
3	T201NZ	Конъюгат, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
4	SP201N	Буфер для разведения образцов, готов к использованию (21 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
5	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	Концентрат отмывочного раствора, 21х-кратный (44 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	Стоп-реагент, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	Бумага для заклеивания планшета	1	шт.	-
9	K201NI	Инструкция по применению Набора реагентов «ТТГ-Нео-ИФА»	2	шт.	-
10	K201NQ	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ТТГ-Нео-ИФА»	1	шт.	-
11	K201AQ	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ТТГ плюс-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- орбитальный шейкер (встряхиватель) для микропланшет, скорость 600–800 об/мин
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.
- устройство для приготовления дисков из пятна (панчер)

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «ТТГ-НЕО-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- буфер для разведения образцов, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные после вскрытия упаковки следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 1 месяца
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. 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 °С), избегая попадания прямых солнечных лучей.

Размер насковзь 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.

8.5. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации тиреотропного гормона в контрольной сыворотке.

8.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 16 лунок для калибровочных проб.
2	Внесите во все лунки планшета по 200 мкл Буфера для разведения образцов.
3	При помощи пинцера из пятен крови с калибровочными пробами выбить диски диаметром около 3,2 мм. ВНИМАТЕЛЬНО: выбиваемые диски должны быть полностью пропитаны кровью с обеих сторон, в противном случае будут получены ложные результаты.
4	Внесите в дубликатах по 1 диску каждой калибровочной пробы. В остальные лунки внесите в дубликатах по 1 диску исследуемых образцов.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение ночи (12–18 часов) при температуре +18...+25 °С и постоянном встряхивании со скоростью 600 об/мин
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунки аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавляйте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остаток жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +18...+25 °С и постоянном встряхивании со скоростью 600 об/мин
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реактанта, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реактанта. Бланк фотометра выставьте по калибровочной пробе С1.
13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – концентрация ТТГ в калибровочных пробах (мкМЕ/мл крови), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание ТТГ в исследуемых образцах.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. 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 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 (Т4) и трийодтиронина (Т3).

Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание.

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

$\text{ТТГ мкМЕ/мл сыворотки} = 2,2 \text{ ТТГ мкМЕ/мл крови.}$

По вопросам, касающимся качества Набора «**ТТГ-НЕО-ИФА**», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of TSH in human newborn blood specimens dried on filter paper

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of TSH in newborn blood specimens dried on filter paper.

This kit is designed for measurement of TSH in newborn blood specimens dried on filter paper. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

TSH-Neo ELISA is intended for the quantitative determination of Thyroid Stimulating Hormone (TSH) in newborn blood specimens dried on filter paper and used as a screening test for congenital hypothyroidism in babies.

TSH is a glycoprotein with MM ca. 30 kDa which is secreted by the anterior lobe of the pituitary gland. TSH molecule is combined from two non-covalently bound polypeptide chains: alpha-chain and beta-chain. Specificity and biological activity of TSH is caused by its beta-chain. Congenital hypothyroidism is a hereditary pathology expressed in altered thyroid function and found with prevalence ca 1:3500 – 1:4000.

Congenital hypothyroidism is characterized by a decreased secretion of thyroid hormones – T3 and T4, this in turn upregulating TSH secretion and leading to elevated TSH levels in blood.

Screening of newborns with congenital hypothyroidism is based on cut-off TSH value. If TSH value obtained is higher than the cut-off, it indicates a possible pathological state and requires additional laboratory investigations. To confirm the diagnosis, quantification of TSH and T4 in serum is required.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal antibodies to human TSH β -chain. Antigen from the paper disc is eluted and captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies – murine monoclonal antibodies to human TSH β -chain, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	TSH-Neo EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2	Calibrator set, 2 pcs each. The set contains 6 calibrators; 0, 10, 25, 50, 100, 250 µIU/ml human blood specimens dried on filter paper	6	pcs		2 months
3	Conjugate, 11 ml	1	pcs	red	until exp.date
4	EIA Sample buffer 22 ml	1	pcs	blue	until exp.date
5	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
6	Washing solution concentrate 21x, 44 ml	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 1 month at +2...+8 °C or 5 days at RT
7	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
8	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
9	Instruction TSH-Neo EIA	1	pcs		N/A
10	QC data sheet TSH-Neo EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Microtiter plate shaker. Shaking should be medium to vigorous. Longitudinal shaking approximately 200 strokes/min, oscillations 600–800/min
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0.
- Puncher to obtain specimen paper discs from dried blood spots.

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at 2 to 8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with blood specimens dried on filter paper. Blood is taken with a sterile scarifier from a finger or a heel. It is essential that blood spots are collected by application of a single drop of blood on a special blank printed on a filter paper. Layering of successive drops will lead to elevated results. It is also important that the blood penetrates the filter paper from one side to the other to produce just the same spot from the both sides. The obtained spots should be dried in horizontal position for 2–3 hrs at RT (+18...+25 °C) avoiding direct sunlight.

Blood spot size should be nlt 12 mm diameter; nlt three such spots should be obtained. Blood applied on a filter paper should not contain EDTA – it may cause false results.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1–6 and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Pipet 200 µl of EIA Sample buffer into each well.
3	Using disc puncher, obtain discs of ca. 3.2 mm diameter from calibrators and unknown specimens blood spots. IMPORTANT: the discs obtained should be completely immersed with blood from both sides – otherwise, the results may be false.)
4	Dispense in duplicates discs from calibrators, controls and unknown specimens in the appropriate wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
5	Incubate overnight (12–18 hrs) at +18...+25 °C and continuous shaking at 600 rpm
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 5 times
7	Aspirate the contents of the wells by disc remover. Wash strips 5 times.
8	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
9	Incubate 60 minutes at +18...+25°C and continuous shaking at 600 rpm
10	Wash the strips 5 times.
11	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
12	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
13	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
14	Measure OD (optical density) at 450 nm.
15	Set photometer blank on first calibrator
16	Apply point-by-point method for data reduction.

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

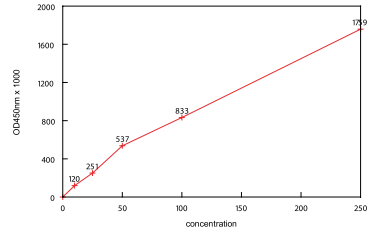
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus TSH concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of TSH in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 μ IU/ml	0.097
CAL 2	10 μ IU/ml	0.217
CAL 3	25 μ IU/ml	0.348
CAL 4	50 μ IU/ml	0.634
CAL 5	100 μ IU/ml	0.930
CAL 6	250 μ IU/ml	1.856



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own cut-off value for TSH-Neo. Based on data obtained by XEMA, the following cut-off is recommended: 20 μ IU/ml blood (equivalent to 44 μ IU/ml serum with hematocrit value 50-55%). TSH-Neo value higher than 20 μ IU/ml is indicative of possible thyroid pathology which requires additional laboratory investigations. All samples with values higher than the cut-off should be retested to exclude false-positive results.

If the retested sample gives elevated results again, a new blood specimen should be taken from the same newborn.

If the result is within 20-100 μ IU/ml, the blood sample is taken on filter paper blank and dried blood specimen should be investigated.

If the result is higher than 100 μ IU/ml, a serum sample should be obtained and used for quantitative determination of TSH, T4 and T3.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
HCG	<0.1
LH	<0.1
FSH	<0.1

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 3 μ IU/ml.

11.3. Repeatability

RSD, % for the same blood specimen is nmt 15%