



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.3
Тел/Факс (37517) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ИРМА-ТТГ-СТ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ № ИМ-7.93260/1210 от 10.10.2012 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-ТТГ-СТ предназначен для определения концентрации тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови человека методом иммунорадиометрического анализа. Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2 Тиреотропный гормон секретируется передней долей гипофиза, является гликопротеином с молекулярной массой около 20 кДа. ТТГ состоит из двух различных нековалентно связанных субъединиц, обозначаемых как альфа и бета. Альфа субъединица является общей для таких гликопротеидных гормонов как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ) и хорионический гонадотропин (ХГ). Бета-субъединица определяет биологическую и иммунологическую специфичность, что позволяет распознавать и отличать ТТГ от других гликопротеидных гормонов с помощью антител. ТТГ стимулирует активность щитовидной железы, усиливая как иодирование, так и выделение тиреоидных гормонов – тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). В свою очередь, связывание T_3 рецепторами ТТГ-секретирующих клеток гипофиза замыкает цепь отрицательной обратной связи, которая поддерживает концентрацию тиреоидных гормонов на постоянном уровне. В связи с ключевой ролью ТТГ в регуляции синтеза и секреции тиреоидных гормонов, измерение его концентрации в крови имеет большое значение для диагностики и мониторинга нарушений в системе "гипофиз – щитовидная железа".

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [^{125}I]-моноклональные антитела к ТТГ, общая активность (200-570 кБк), жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 11 мл;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к ТТГ, готовы к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы ТТГ, содержащие известные количества ТТГ в диапазоне концентраций (0; 0,15-50) мМЕ/л (точные значения концентраций ТТГ указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 7 флаконов по 1 мл;
- концентрат промывочного раствора (КПР), 1 флакон, 25 мл;
- контрольные сыворотки (КС-1 и КС-2) - лиофилизованные препараты, содержащие известное количество ТТГ, 2 флакона.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных проб, 1 пробы общей активности [^{125}I]-моноклональных антител к ТТГ, 7 калибровочных проб и 2 проб контрольных сывороток, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 2 ч. Диапазон определяемых концентраций ТТГ – (0,02-50) мМЕ/л.

2.4 В основе определения ТТГ лежит иммунорадиометрический метод. В наборе используются моноклональные антитела, специфичные к двум различным эпитопам молекулы ТТГ и не проявляющие между собой конкуренции. Калибровочные или исследуемые образцы инкубируют в пробирках с иммобилизованным первым моноклональным анти-

телом в присутствии второго моноклонального антитела, меченного йодом-125. После инкубации содержимое пробирок удаляют и измеряют связанную активность йод-125 на гамма-счетчике. Концентрацию ТТГ, прямо пропорциональную измеренной скорости счета, определяют по калибровочной кривой.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [^{125}I]-моноклональные антитела к ТТГ являются источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [^{125}I] – 60,1 сут.

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (РВ) (Нормы радиационной безопасности ГН 2.6.1.8-127 и Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности СанПиН 2.6.1.8-8).

ВНИМАНИЕ! Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с РВ, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

Запрещается при работе с РВ иметь на рабочем месте постороннее оборудование и личные вещи.

Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с РВ.

3.3 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные передавать ВИЧ, вирус гепатита В или другие вирусные инфекции.

3.4 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.5 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

4.1 Гамма-счетчик колодезного типа;

- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа (не менее 350 встряхиваний в мин.);
- водоструйный насос;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,1 и 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штатив для пробирок;
- стакан химический или колба плоскодонная вместимостью 500 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

5.1 Компоненты набора перед использованием необходимо выдерживать при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Внести в колбу вместимостью 500 мл с помощью мерного цилиндра 475 мл дистиллированной водой, добавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке. Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

5.3 Во флаконы, содержащие контрольные сыворотки, внести по 1 мл дистиллированной воды. Через 30 мин осторожно перемешать содержимое флакона, избегая образования пены. При вскрытии и растворении необходимо следить, чтобы на колпачках не осталось сухого вещества.

Разведенные контрольные сыворотки можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 24 ч. При необходимости более длительного хранения, контрольные сыворотки следует разделить на несколько аликвот и заморозить при минус 20 °С. Избегать повторного замораживания и размораживания образцов.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к ТТГ маркировать следующим образом (в дубликатах): В₀-В₆ – для калибровочных проб ТТГ; В_{КС-1} и В_{КС-2} – для контрольных сывороток; В_х – для исследуемых проб сыворотки крови.

6.2 В пробирки В₀-В₆ внести по 0,1 мл (100 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки В_{кс-1} и В_{кс-2} внести по 0,1 мл (100 мкл) контрольных сывороток. В пробирки В_х внести по 0,1 мл (100 мкл) исследуемых проб сывороток крови.

6.3 Во все пробирки внести по 0,1 мл (100 мкл) [¹²⁵I]-моноклональных антител к ТТГ.

6.4 Инкубировать все пробирки при постоянном встряхивании на приборе для встряхивания пробирок (не менее 350 встряхиваний в мин). в течение 1 ч и температуре (18-25) °С.

6.5 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса.

6.6 Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора (см.п.5.2). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки. После промывки в пробирках не должно оставаться следов окрашенной жидкости.

6.7 Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [¹²⁵I] в каждой пробирке в течение 1 мин.

6.8 Последовательность внесения реагентов в пробирки и проведение других операций анализа приведены в таблице 1. Данную последовательность не нарушать!

Таблица 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	Калибровочные пробы, контрольные и исследуемые сыворотки, мл	[¹²⁵ I]-моноклональные антитела к ТТГ, мл	Инкубировать при постоянном встряхивании в течение 1 ч и температуре ((18-25) °С	После инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса
В ₀ -В ₆	0,1	0,1		
В _{кс-1}	0,1	0,1		
В _{кс-2}	0,1	0,1		
В _х	0,1	0,1		

Продолжение таблицы 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций				
	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса	Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса	Измерить скорость счета [¹²⁵ I] в каждой пробирке в течение 1 мин
В ₀ -В ₆	2,0		2,0		
В _{кс-1}	2,0		2,0		
В _{кс-2}	2,0		2,0		
В _х	2,0		2,0		

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [¹²⁵I] для каждой пары пробирок и рассчитать величину отношения (В₆-В₀)/Т, (В_і-В₀)/(В₆-В₀), % для каждой калибровочной пробы, контрольной и исследуемой сыворотки, где В_і – среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I] в пробирках В₁-В₆, В_{кс-1}, В_{кс-2} и В_х.

7.2 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения (В_і-В₀)/(В₆-В₀), % , а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций ТТГ в мМЕ/л в соответствующих калибровочных пробах.

Определить по калибровочной кривой концентрацию ТТГ в мМЕ/л в контрольных и исследуемых сыворотках крови.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Чувствительность

8.1.1 Минимальная концентрация ТТГ, определяемая с помощью набора, составляет 0,02 мМЕ/л.

8.2 Воспроизводимость результатов

8.2.1 Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации ТТГ в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием ТТГ не превышает 8%.

8.3 Тест на "открытие"

8.3.1 Процент "открытия" ТТГ, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией ТТГ, составляет 90-110%.

8.4 Тест на параллелизм

8.4.1 Кривая, отражающая разведение контрольной сыворотки с высоким содержанием ТТГ, параллельна стандартной калибровочной кривой.

8.5 Клиническая проверка набора

8.5.1 При клинических испытаниях набора получены следующие диапазоны концентраций ТТГ в сыворотке крови:

- эутиреоз – 0,17 – 4,05 мМЕ/л;
- гипертиреоз - ≤ 0,15 мМЕ/л;
- гипотиреоз - > 5 мМЕ/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций ТТГ, соответствующие нормальным.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Компоненты набора должны храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

9.2 Определение концентрации ТТГ с помощью набора ИРМА-ТТГ-СТ проводят в сыворотке крови человека.

Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 24 ч, или при минус 20 °С в течение длительного времени. Необходимо избегать повторного замораживания и размораживания образцов.

9.3 Исследуемые образцы сыворотки крови следует проверять на остаточную активность радионуклидов, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

9.4 Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

9.5 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

9.6 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

0

Приложение А
(Информационное)
Библиография

- [1] Приказ №351 от 16.12.98г. Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [2] СП 17-69 РБ 98 Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний
- [3] Приказ №165 МЗ РБ от 25.11.2002 г. О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения