



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. Академика Купревича В.Ф., 5, корп.3
Факс (017) 263-62-57

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОГЛОБУЛИНА
В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

ИРМА-ТГ-СТ

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
30.06.2010 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-ТГ-СТ предназначен для определения концентрации тиреоглобулина (ТГ) в сыворотке или плазме крови человека методом иммунорадиометрического анализа.

Набор предназначен для применения только «in vitro».

1.2 ТГ - гликопротеин с молекулярной массой 660 кДа, является основным компонентом коллоида фолликулов щитовидной железы, продуцируется фолликулярными клетками и служит основой для синтеза тиреоидных гормонов: тироксина и трийодтиронина. Повышение уровня ТГ в крови является следствием структурно-функциональных изменений щитовидной железы и наблюдается при различных ее заболеваниях - тиреотоксикозе, доброкачественных и злокачественных опухолях.

В клинике определение уровня ТГ с помощью набора ИРМА-ТГ-СТ может быть использовано для раннего выявления рецидивов и метастазов высокодифференцированного рака щитовидной железы у оперированных больных (определение уровня ТГ нельзя применять для дооперационной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей щитовидной железы), для оценки эффективности радиойодтерапии метастазов рака щитовидной железы, для определения степени тяжести тиреотоксикоза и контроля за эффективностью его лечения.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [¹²⁵I]-моноклональные антитела к ТГ, жидкий препарат, готовый к использованию, 1 флакон, 55 мл, общая активность < 450 кБк;

- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к ТГ, готовые к использованию, 100 шт.;

- 7 калибровочных проб ТГ, содержащих тиреоглобулин в буферном растворе с бычьим сывороточным альбумином и азидом натрия (менее 0,1%) в диапазоне концентраций (0; 2 – 500) мкг/л (точные значения концентраций ТГ указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовые к использованию, калибровочная проба С₀ - 6 мл, 1 флакон; калибровочные пробы С₁ - С₆ - 6 флаконов по 1 мл;

- контрольная проба ТГ для теста на "открытие", содержащая известное количество ТГ (точное значение концентрации ТГ указывается на этикетке флакона), жидкий препарат, готовый к использованию, 1 флакон, 4 мл;

- буферный раствор, готовый к использованию, 1 флакон, 50 мл;

- концентрат промывочного раствора, 1 флакон, 50 мл;

- контрольные сыворотки № 1 и № 2, содержащие известные количества ТГ в сыворотке крови доноров с азидом натрия (менее 0,1%), лиофилизированные из объема 1 мл препараты, 2 флакона.

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

2.3 Продолжительность анализа (22-25) ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций ТГ (1-500) мкг/л.

2.5 Принцип работы набора состоит в следующем. ТГ, присутствующий в сыворотке или плазме крови человека, связывается с иммобилизованными на стенках пробирок моноклональными антителами к ТГ. После первой инкубации несвязавшийся ТГ удаляют с помощью промывки. Во время второй инкубации с ТГ связываются меченные [¹²⁵I]-моноклональные антитела к ТГ. Несвязавшиеся меченые антитела удаляют с помощью промывки пробирок. Концентрацию ТГ в исследуемых пробах сыворотки или плазмы крови определяют по калибровочной кривой зависимости активно-

сти связанных меченых антител от концентрации ТГ в калибровочных пробах.

2.6 Присутствие аутоантител к ТГ в сыворотке (плазме) крови может оказывать влияние на результаты определения ТГ. Возможность интерференции (ложного занижения результатов) при определении ТГ необходимо проверять для тех проб сывороток (плазмы) крови у которых присутствуют антитела к ТГ с помощью теста на "открытие".

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [¹²⁵I]-моноклональные антитела к ТГ являются источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа ¹²⁵I - 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 спецодежду (халат) и одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.4 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности, предусмотренных приказами МЗ РБ № 66 и № 351. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями ОСТ 42-21-2-85.

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

**4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ,
НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

4.1. Гамма-счетчик, позволяющий измерять активность изотопа [¹²⁵I];

- прибор для встряхивания пробирок;

- вихревой смеситель;

- водоструйный насос типа КМ-1230;

- магнитная мешалка;

- пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,1; 0,15; 0,4; 0,5; 2,0 мл;

- пробирки пластмассовые вместимостью 3-5 мл;

- штатив для пробирок;

- перчатки хирургические резиновые;

- стакан стеклянный вместимостью 1000 мл;

- колба плоскодонная вместимостью 1000 мл;

- вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

5.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Внести в колбу плоскодонную вместимостью 1000 мл с помощью стакана стеклянного 950 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке.

Разбавленный промывочный раствор может храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

5.3 Во флаконы содержащие контрольные сыворотки № 1 и № 2 внести по 1 мл дистиллированной воды. Через 10 мин тщательно перемешать содержимое флаконов, избегая образования пены.

Контрольные сыворотки, подготовленные к использованию, могут храниться при температуре (2-8)°С в течение 24 ч. При необходимости более длительного хранения, контрольные сыворотки следует разделить на аликвоты и хранить при температуре не менее минус 20°С, исключив повторное замораживание.

5.4 Подготовка проб для теста на «открытие».

5.4.1 Подготовить серию пластмассовых пробирок для проб теста на «открытие».

5.4.2 Внести в соответствующие пробирки по 0,15 мл исследуемых проб сыворотки или плазмы крови.

5.4.3 Внести во все пробирки по 0,15 мл контрольной пробы ТГ для теста на «открытие», входящей в состав набора, и тщательно перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к ТГ маркируют (в дубликатах) следующим образом: Т - общая активность [¹²⁵I]-моноклональных антител к ТГ, В₀ - В₆ - калибровочные пробы ТГ, В_{к1} и В_{к2} - контрольные сыворотки №1 и №2, Вх - исследуемые пробы сыворотки или плазмы крови, Вх-о - пробы теста на «открытие», подготовленные в соответствии с п. 5.4.

6.2 Внести в пробирки:

В₀ - В₆ - по 0,1 мл (100 мкл) соответствующих калибровочных проб;

В_{к1} и В_{к2} - по 0,1 мл (100 мкл) соответствующих контрольных сывороток;

Вх - по 0,1 мл (100 мкл) исследуемой сыворотки или плазмы крови;

Вх-о - по 0,1 мл (100 мкл) проб теста на «открытие».

6.3 Во все пробирки, кроме Т, внести по 0,4 мл (400 мкл) буферного раствора.

6.4 Инкубировать все пробирки в течение 3 ч при постоянном встряхивании на приборе для встряхивания пробирок (не менее 350 встряхиваний в мин) при температуре (18-25) °С.

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

6.6 Во все пробирки, кроме Т, внести по 2 мл промывочного раствора. Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.

6.7 Во все пробирки внести по 0,5 мл [¹²⁵I]-моноклональных антител к ТГ.

6.8 Пробирки инкубировать в течение (18-22) ч при температуре (18-25) °С.

6.9 После инкубации тщательно удалить из всех пробирок, кроме Т, содержимое с помощью водоструйного насоса.

6.10 Во все пробирки, кроме Т, внести по 2 мл промывочного раствора. Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.

После промывки в пробирках не должно оставаться следов красителя.

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

6.12 Последовательность операций при проведении анализа приведена в таблице 1. Данную последовательность не нарушать!

Таблица 1

| Пробирки в дубликатах | Калибровочные пробы, контрольные и исследуемые сыворотки, мл | Буферный раствор, мл | Инкубировать 3 ч при постоянном встряхивании и температуре (18-25) °С | Удалить из всех пробирок содержимое с помощью водоструйного насоса. Во все пробирки, кроме Т, внести по 2 мл промывочного раствора. Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки. |
|-----------------------------------|--|----------------------|---|--|
| Т | - | - | | |
| В ₀ -В ₆ | 0,1 | 0,4 | | |
| В _{к1} , В _{к2} | 0,1 | 0,4 | | |
| Вх | 0,1 | 0,4 | | |
| Вх-о | 0,1 | 0,4 | | |

Продолжение таблицы 1

| Пробирки в дубликатах | [¹²⁵ I]-моноклональные антитела к ТГ, мл | Инкубировать (18-22) ч при температуре (18-25) °С | Удалить из всех пробирок, кроме Т, содержимое с помощью водоструйного насоса. Во все пробирки, кроме Т, внести по 2 мл промывочного раствора. Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки. |
|--|--|---|--|
| Т | 0,5 | | |
| В ₀ -В ₆ | 0,5 | | |
| В _{к1} , В _{к2} | 0,5 | | |
| Вх | 0,5 | | |
| Вх-о | 0,5 | | |
| Измерить скорость счета [¹²⁵ I] в течение 1 мин. | | | |

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [¹²⁵I] для каждой пары пробирок.

7.2 Рассчитать величину (В₀-В_х)/Т×100, в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной сыворотки, исследуемой пробы сыворотки или плазмы крови и пробы теста на «открытие», где В₀ - средние арифметические значения скоростей счета [¹²⁵I] в

пробирках В₁ - В₆, В_{к1}, В_{к2}, Вх, Вх-о; В₀ - среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I] в пробирках В₀ (неспецифическое связывание); Т - среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I] в пробирках Т.

7.3 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения (В₀-В_х)/Т×100, в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) - значения концентраций ТГ в мкг/л в соответствующих калибровочных пробах. По калибровочной кривой определить концентрацию ТГ в контрольных сыворотках, исследуемых пробах сыворотки или плазмы крови и пробах теста на «открытие».

7.4 Рассчитать «открытие», в процентах, по формуле (1):

$$\frac{2 \times C_{x-o}}{C_x + C_{k-т}} \times 100 \quad (1),$$

где С_{х-о} - концентрация ТГ в пробах теста на «открытие»;

С_х - концентрация ТГ в исследуемых пробах сыворотки или плазмы крови;

С_{к-тг} - концентрация ТГ в контрольной пробе ТГ для теста на «открытие», входящей в состав набора (значение концентрации ТГ указано на этикетке флакона).

Интерпретация результатов:

«Открытие» (%): 80-120 - интерференция отсутствует
70-80 - интерференция возможна
< 70 - интерференция аутоантител.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

В данном анализе отсутствуют перекрестные реакции с Т₃, Т₄, сывороточным альбумином человека, иммуноглобулином G человека.

8.2 Чувствительность анализа.

Минимальная концентрация ТГ, определяемая с помощью набора, составляет 0,5 мкг/л.

8.3 Воспроизводимость результатов.

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации ТГ в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием ТГ с использованием набора ИРМА-ТГ-СТ не превышает 8%.

8.4 Тест на «открытие».

Процент «открытия» ТГ, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией ТГ, составляет (90-110)%.

8.5 Тест на параллелизм.

Кривая, отражающая разведение контрольной сыворотки крови с высоким содержанием ТГ, параллельна стандартной калибровочной кривой.

8.6 Клиническая проверка набора

При использовании набора ИРМА-ТГ-СТ концентрация ТГ в сыворотке крови здоровых лиц обоего пола находится в диапазоне (0 - 50) мкг/л, составляя в среднем ~ 18 мкг/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций ТГ, 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 ТГ с помощью набора ИРМА-ТГ-СТ проводят в сыворотке или плазме крови. Плазму крови получают с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА.

9.3 Образцы сыворотки или плазмы крови хранят при температуре (2-8)°С, если анализ проводят в течение 24 ч после взятия крови. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре минус 20 °С. Допускается только однократное замораживание и размораживание образцов.

9.4 Образцы сыворотки или плазмы крови с предполагаемым высоким уровнем ТГ рекомендуется разводить "нулевой" калибровочной пробой (С₀), входящей в состав набора.

9.5 У пациентов, получающих терапевтические дозы биотина, определение концентрации ТГ в сыворотке или плазме крови с помощью набора ИРМА-ТГ-СТ следует проводить не ранее 24 ч после последнего приема биотина.

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

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

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