

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) 211-80-19, 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ИРМА-ТТГ-СТ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь
_____ В.П.Руденко
"26" июня 2002 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1. Набор ИРМА-ТТГ-СТ предназначен для определения концентрации тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке или плазме 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 цитовидной 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 – цитовидная 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 (0-50) мМЕ/л (точные значения концентраций ТТГ указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 7 флаконов по 1,0 мл.

концентрат промывочного раствора, 1 флакон, 25 мл; контрольные сыворотки (КС-1 и КС-2) - лиофилизированные препараты, содержащие известное количество ТТГ, 2 флакона.

2.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной пробы, 7 калибровочных проб и 2 проб контрольных сывороток, всего 100 определений.

2.3. Продолжительность анализа 2 часа. Диапазон определяемых концентраций ТТГ – (0,15-50) 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 антителом в присутствии второго моноклонального антитела, меченного йодом-125. После инкуба-

ции 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 $[^{125}I]$ – 60,04 суток.

3.2. При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (РВ) по 3-му классу работ (Нормы радиационной безопасности НРБ-2000 и Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности ОСП-2002).

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, предусмотренных приказами МЗ РБ № 66 и № 351.

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 колодезного типа; горизонтальный встряхиватель пробирок (не менее 350 вст/мин);

водоструйный насос типа КМ-1230;

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;

вода дистиллированная;

перчатки резиновые хирургические.

5. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

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

5.2. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора перелить в мерный стакан вместимостью 500 мл и довести объем промывочного раствора до 500 мл дистиллированной водой. Тщательно перемешать на магнитной мешалке. Приготовленный промывочный раствор можно хранить при (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

5.3. Во флаконы, содержащие контрольные сыворотки, внести дистиллированную воду в объеме, указанном на этикетке флакона. Через 30 минут осторожно перемешать содержимое флакона, избегая образования пены.

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

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к ТТГ маркировать следующим образом (в дубликатах): V_0 – для калибровочных проб ТТГ; $V_{КС-1}$ и $V_{КС-2}$ для контрольных сывороток; V_X – для исследуемых проб сыворотки или плазмы крови;

6.2. В пробирки V_0 - V_6 внести по 0,1 мл соответствующих калибровочных проб. В пробирки $V_{КС-1}$ и $V_{КС-2}$ внести по 0,1 мл контрольных сывороток. В пробирки V_X внести по 0,1 мл исследуемых сывороток или плазмы крови.

6.3. Во все пробирки внести по 0,1 мл $[^{125}I]$ -моноклональных антител к ТТГ.

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

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

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

6.7. 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			После инкубации аккуратно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса
	Калибровочные пробы, контрольные и исследуемые сыворотки, мл	[¹²⁵ I]-моноклональные антитела к ТТГ, мл	Инкубировать в течение 1 ч при комнатной температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании	
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 Vi / V₀ для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки, где Vi – среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I] в пробирках В₁-В₆, В_{КС-1}, В_{КС-2} или В_Х.

7.2. Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения Vi (имп/мин) или Vi / V₀, 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 или плазме крови.

8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1. Чувствительность.

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

8.2. Воспроизводимость результатов.

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".

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

8.4. Тест на параллелизм.

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

8.5. Клиническая проверка набора.

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

зутиреоз – 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 или плазме крови человека. Плазму крови получают с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА.

Образцы сыворотки или плазмы крови можно хранить при (2-8) °С в течение 24 ч или при минус 20 °С в течение длительно-

го времени. Необходимо избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

9.3. Исследуемые образцы сыворотки или плазмы 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 воспроизводимости результатов пипетирования.

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