

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 РЕАКТИВОВ ДЛЯ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ИРМА-АНТИ-ТГ-СТ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь
_____ А.С. Романенков
"30" 08 2004 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ИРМА-АНТИ-ТГ-СТ предназначен для определения концентрации аутоантител к тиреоглобулину (анти-ТГ) в сыворотке или плазме крови человека методом иммунорадиометрического анализа. Набор предназначен для применения только "in vitro".

1.2 Результаты измерения содержания анти-ТГ могут быть использованы для диагностики аутоиммунных тиреоидных заболеваний – тиреоидита Хашимото, идиопатической микседемы, диффузного токсического зоба. Анти-ТГ обнаруживается также у больных раком щитовидной железы, и их определение может быть использовано для прогнозирования течения злокачественного процесса.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [¹²⁵I]-белок А, жидкий препарат, готовый к использованию, 1 флакон, 55 мл, общая активность <350 кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованным тиреоглобулином, готовые к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы анти-ТГ в диапазоне концентраций (0-6000) МЕ/мл (точные значения концентраций анти-ТГ указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 6 флаконов по 0,5 мл (калибровочные пробы анти-ТГ откалиброваны относительно международного стандартного образца WHO IRP 65/93);
- буферный раствор для разведения, готовый к использованию, 1 флакон, 125 мл;
- концентрат промывочного раствора, жидкий препарат, 1 флакон, 50 мл;
- контрольная сыворотка (КС), лиофилизированный препарат, 1 флакон.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных проб, 1 пробы общей активности [¹²⁵I]-белка А, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 5 ч.

2.4 Принцип метода состоит в следующем. Анти-ТГ, присутствующие в сыворотке или плазме крови человека, связываются с иммобилизованным на пробирках тиреоглобулином. Пробирки промывают и инкубируют с меченым [¹²⁵I] белком А, который связывается с анти-ТГ. Несвязавшийся [¹²⁵I]-белок А удаляют с помощью водоструйного насоса. Концентрацию анти-ТГ в исследуемых пробах сыворотки или плазмы крови человека определяют по калибровочной кривой зависимости активности связанного [¹²⁵I]-белка А от концентрации анти-ТГ в калибровочных пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [¹²⁵I]-белок А является источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [¹²⁵I] – 60,04 сут.

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (РВ) (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 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;

- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- вихревой смеситель типа ВП;
- водоструйный насос типа KM-1230;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,02; 0,025; 0,5 и 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и схожести результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- пробирки пластмассовые вместимостью 3-5 мл с пробками;
- штатив для пробирок;
- стакан химический или колба плоскодонная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки хирургические резиновые.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

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

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

5.3 Во флакон, содержащий контрольную сыворотку, внести 0,5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать до полного растворения препарата, избегая образования пены.

5.4 Разведение контрольной сыворотки и исследуемых проб сыворотки или плазмы крови человека.

5.4.1 Подготовить серию пластмассовых пробирок (не из набора) для разведения контрольной сыворотки и исследуемых проб сыворотки или плазмы крови человека.

5.4.2 Внести в соответствующие пробирки (на дно пробирок) по 0,025 мл (25 мкл) контрольной сыворотки или исследуемых проб сыворотки или плазмы крови человека.

5.4.3 Внести во все пробирки по 0,5 мл (500 мкл) буферного раствора для разведения и перемешать содержимое пробирок с помощью вихревого смесителя. Разбавленные контрольная сыворотка и исследуемые пробы сыворотки или плазмы крови человека могут храниться при (2-8) °С в течение 3 дней.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованным тиреоглобулином маркируют следующим образом (в дубликатах): Т – для определения общей активности [¹²⁵I]-белка А; В₀-В₅ – для калибровочных проб анти-ТГ; В_{КС} – для контрольной сыворотки; В_х – для исследуемых проб сыворотки или плазмы крови человека.

6.2 В пробирки В₀-В₅ внести по 0,020 мл (20 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки В_{КС} внести по 0,020 мл (20 мкл) предварительно разведенной (п.5.4.) контрольной сыворотки. В пробирки В_х внести по 0,020 мл (20 мкл) предварительно разведенных (п.5.4.) исследуемых сывороток или плазмы крови человека.

6.3 Во все пробирки, кроме Т, внести по 0,5 мл (500 мкл) буферного раствора для разведения.

6.4 Содержимое пробирок инкубировать в течение 2 ч при постоянной "мягком" встряхивании (приблизительно 300 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок при комнатной температуре (18-25) °С.

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

6.6 Во все пробирки, кроме Т, внести по 2 мл промывочного раствора (см.п.5.2). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок, кроме Т, с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.

6.7 Во все пробирки внести по 0,5 мл (500 мкл) [¹²⁵I]-белка А.

6.8 Пробирки инкубировать в течение 2 ч при комнатной температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании на приборе для встряхивания пробирок.

6.9 После окончания инкубации аккуратно удалить из всех пробирок, кроме Т, жидкость с помощью водоструйного насоса.

6.10 Во все пробирки, кроме Т, внести по 2 мл промывочного раствора (см.п.5.2). Сразу после внесения удалить промывочный раствор из всех пробирок, кроме Т, с помощью водоструйного насоса.

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

Таблица 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.
	Калибр-пробы, разведенные КС и исследуемые пробы, мл	Буферный раствор для разведения, мл	Содержимое пробирок инкубировать 2 ч при комнатной температуре (18-25) °С при постоянном встряхивании. После инкубации аккуратно удалить из всех пробирок, кроме Т, жидкость с помощью водоструйного насоса		
Т	-	-		-	
В ₀ -В ₅	0,020	0,5		2	
В _{КС}	0,020	0,5		2	
В _Х	0,020	0,5		2	

Продолжение таблицы 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			Промывочный раствор, мл	Сразу удалить раствор с помощью водоструйного насоса. Измерить скорость счета [¹²⁵ I] в каждой пробирке в течение 1 мин
	[¹²⁵ I]-белок А, мл	Пробирки инкубировать 2 ч при температуре (18-25) °С при постоянном встряхивании. После инкубации аккуратно удалить из всех пробирок, кроме Т, жидкость с помощью водоструйного насоса			
Т	0,5			-	
В ₀ -В ₅	0,5			2	
В _{КС}	0,5			2	
В _Х	0,5			2	

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [¹²⁵I] для каждой пары пробирок. Из полученных значений скоростей счета, кроме значения скорости счета в пробирках Т, вычесть среднее арифметическое значение скорости счета в пробирках В₀.

7.2 Рассчитать величину (В_і-В₀)/Т, в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки крови человека, где В_і – среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I] в пробирках В₁-В₅, В_{КС} и В_Х.

7.3 Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения (В_і-В₀)/Т, в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций анти-ТГ, в МЕ/мл, в соответствующих калибровочных пробах.

Определить по калибровочной кривой концентрацию анти-ТГ, в МЕ/мл, в контрольной и исследуемой сыворотке или плазме крови человека. При определении концентрации анти-ТГ фактор разведения не учитывается, так как он учтен при построении калибровочной кривой.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

Использование высокоочищенного ТГ для иммобилизации на пробирках обеспечивает высокую специфичность анализа.

8.2 Чувствительность анализа

Минимальная концентрация анти-ТГ, определяемая с помощью набора, составляет 10 МЕ/мл.

8.3 Воспроизводимость результатов

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

8.4 Тест на "открытие"

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

8.5 Тест на параллелизм

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

8.6 Клиническая проверка набора

При использовании набора ИРМА-АНТИ-ТГ-СТ концентрация анти-ТГ в сыворотке крови здоровых лиц обоего пола (n=100) составляет в среднем 27,7 МЕ/мл; в 98% сывороток концентрация анти-ТГ не превышает 100 МЕ/мл. Значения концентраций выше 150 МЕ/мл считаются патологическими, больные с результатами в диапазоне (100-150) МЕ/мл нуждаются в динамическом наблюдении.

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

Образцы сыворотки или плазмы крови хранят при температуре (2-8) °С, если анализ проводят в течение 48 ч после взятия крови. Образцы сыворотки или плазмы крови можно хранить при температуре минус 20 °С в течение более длительного времени – не более 3 месяцев (допускается только однократное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

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

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