



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОРАДИОМЕТРИЧЕСКОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОГЛОБУЛИНА
В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
ИРМА-ТГ-СТ**

Согласована Министерством здравоохранения Республики Беларусь _____

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 радиоiodтерапии 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, готовы 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; 1 – 500) мкг/л (точные значения концентраций ТГ указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы 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, готов к использованию, 1 флакон, 4 мл;
- буферный раствор, готов к использованию, 1 флакон, 50 мл;
- концентрат промывочного раствора (КПР), 1 флакон, 50 мл;
- контрольные сыворотки № 1 и № 2 (КС1 и КС2), жидкие препараты, содержащие известные количества ТГ в сыворотке крови доноров с азидом натрия (менее 0,1%), 2 флакона по 1 мл.

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 (0,5-500) 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 калибровочному графику зависимости активности связанных меченых антител от концентрации ТГ в калибровочных пробах.

2.6 Присутствие аутоантител к ТГ в сыворотке (плазме) крови человека 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 (далее-РВ) согласно требованиям Санитарных норм и правил «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при осуществлении деятельности по использованию атомной энергии и источников ионизирующего излучения», утверждённых Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 137 от 31.12.2013 г.

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 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, позволяющий измерять активность изотопа [¹²⁵I];

- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- вихревой смеситель;
- водоструйный насос;
- магнитная мешалка;
- пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,1; 0,15; 0,4; 0,5; 2,0 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);
- пробирки пластмассовые с пробками вместимостью 3-5 мл;
- штатив для пробирок;
- перчатки хирургические резиновые;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба плоскодонная вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

5.2 Хранение реагентов после вскрытия упаковки

Флаконы с реагентами закрывать колпачками сразу после использования, предупреждая их контаминацию.

В ходе анализа допускается хранение реагентов в течение 8 ч при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

Все неиспользованные компоненты набора хранить в плотно закрытой первичной упаковке при температуре (2-8) °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

ВНИМАНИЕ! Все реагенты стабильны при (2-8) °С до окончания срока годности набора, указанного на этикетке. Сроки годности, указанные на этикетках флаконов с реагентами, относятся только к их хранению в производственных условиях вплоть до момента комплектации набора и не распространяются на полученную заказчиком продукцию.

5.3 Приготовление промывочного раствора (разведение в 20 раз).

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

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

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 маркировать (в дубликатах) следующим образом: Т – для определения общей активности [¹²⁵I]-моноклональных антител к ТГ, В₀ - В₆ – для калибровочных проб ТГ, Вкс₁ и Вкс₂ – для контрольных сывороток №1 и №2, Вх – для исследуемых проб сыворотки или плазмы крови человека, Вх-о – для проб теста на "открытие", подготовленные в соответствии с п.5.4.

6.2 Внести в пробирки:

В₀ - В₆ - по 0,1 мл соответствующих калибровочных проб;

Вкс₁ и Вкс₂ - по 0,1 мл соответствующих контрольных сывороток;

Вх - по 0,1 мл исследуемой сыворотки или плазмы крови;

Вх-о - по 0,1 мл проб теста на "открытие".

6.3 Во все пробирки, кроме Т, внести по 0,4 мл 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 окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса.

6.6 Во все пробирки, кроме Т, внести по 2 мл промывочного раствора, приготовленного в соответствии с п.5.2. 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 (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, приготовленного в соответствии с п.5.3. 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 [^{125}I] 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	Последовательность операций			
	Калибровочные пробы, контрольные и исследуемые сыворотки, мл	Буферный раствор, мл	Инкубировать 3 ч при 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 _{кс1} , В _{кс2}	0,1	0,4	
	В _х	0,1	0,4	
	В _{х-о}	0,1	0,4	
Пробирки в дубликатах	Последовательность операций			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.
	[¹²⁵ I]-моноклональные антитела к ТГ, мл	Инкубировать (18-22) ч при температуре (18-25) °С.		
	Т	0,5		
	В ₀ -В ₆	0,5		
	В _{кс1} , В _{кс2}	0,5		
	В _х	0,5		
	В _{х-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 [^{125}I] для каждой пары пробирок.

Из полученных значений скоростей счёта вычесть среднее арифметическое значение скорости счёта в пробирках В₀.

7.2 Рассчитать величины: $(V_6 - V_0)/T$, $(V_i - V_0)/(V_6 - V_0)$, в %, для каждой калибровочной пробы, контрольной сыворотки, исследуемой пробы сыворотки или плазмы крови человека и пробы теста на "открытие", где V_i - средние арифметические значения скоростей счета [^{125}I] в пробирках В₁ - В₆, Вкс₁, Вкс₂, Вх, Вх-о; В₀ - среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках В₀ (неспецифическое связывание); Т - среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках Т.

7.3 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения $(V_i - V_0)/(V_6 - V_0)$, в %, а по оси абсцисс (логарифмическая) - значения концентраций ТГ в мкг/л в соответствующих калибровочных пробах. По калибровочному графику определить концентрацию ТГ в контрольных сыворотках, исследуемых пробах сыворотки или плазмы крови человека и пробах теста на "открытие".

7.4. Рассчитать "открытие", в %, по формуле (1):

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

где C_{x-o} - концентрация ТГ в пробах теста на "открытие";

C_x - концентрация ТГ в исследуемых пробах сыворотки или плазмы крови человека;

$C_{k-тг}$ - 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

Использование высокоспецифичных моноклональных антител к ТГ для иммобилизации на твёрдофазном носителе и для мечения [^{125}I] обеспечивает высокую специфичность анализа.

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. Срок годности набора составляет 60 суток.

9.2 Определение концентрации ТГ с помощью набора ИРМА-ТГ-СТ проводят в сыворотке или плазме крови человека. Плазму крови получают с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА.

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

9.4 Образцы сыворотки или плазмы крови человека с предполагаемым высоким уровнем ТГ рекомендуется разводить "нулевой" калибровочной пробой (C_0), 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 воспроизводимость результатов пипетирования.

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

10 ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

10.1 Результаты определения должны быть интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данных других тестов и иной подходящей информации.

10.2 При выполнении анализа с использованием антител возможна интерференция гетерофильными антителами в пробе пациента. У пациентов, имеющих постоянный контакт с животными или проходивших иммунотерапию или диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или их фрагментов, могут вырабатываться антитела (т.е.НАМА), которые влияют на результат иммунного анализа. Влияние этих антител может привести к получению ошибочных результатов. Тщательно проверяйте результаты анализов пациентов с подозрением на наличие этих антител.

Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
SN	Серийный номер Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	Использовать до Настоящий символ сопровождается датой, указывающей, что изделие рекомендуется использовать до истечения установленного срока; дата состоит из четырех цифр, указывающих год, двух цифр, указывающих месяц, и двух цифр, указывающих день
	Изделие для диагностики in vitro
	Ограничение температуры Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	Изготовитель Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя
	Содержимого достаточно для проведения n-тестирований Настоящий символ сопровождается указанием количества определений
	Знак радиационной опасности Настоящий символ сопровождается указанием общей активности изотопа [¹²⁵ I] в наборе, кБк



УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

Тел./факс +375-17-369-82-57 E-mail:hopmang.bel@gmail.com <http://www.hopiboh.org>

По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в БТК, тел. +375-17-268-87-38

- [1] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 № 351
О пересмотре ведомственных нормативных актов, регламентирующих вопросы по проблеме ВИЧ/СПИД.
- [2] СП 17-69 РБ 98
«Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний» утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1998 г. №18
- [3] Приказ №165 МЗ РБ от 25.11.2002 г.
О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения

Инструкция составлена сотрудниками УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»:

Начальник научно-технического отдела, к.б.н.

А.И.Щербань

Инженер-технолог 2 категории

Т.А.Бараненко