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

ИРМА-ТТГ-СТ

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 – гликопротеин с молекулярной массой около 28 кДа, секретируемый тиротропными клетками передней доли гипофиза. 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. Основной функцией ТТГ является регуляция синтеза и секреции тиреоидных гормонов – тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). Когда система гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа функционирует нормально, снижение уровня тиреоидных гормонов приводит к повышению концентрации ТТГ и увеличению секреции T_4 и T_3, и наоборот, при избыточном количестве тиреоидных гормонов происходит подавление секреции ТТГ (принцип отрицательной обратной связи). 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.

2.1 Состав набора:

- [^{125}I]-моноклональные антитела к ТТГ, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 11 мл, общая активность (200-570) кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к ТТГ, готовы к использованию, 100 шт.;
- семь калибровочных проб в диапазоне концентраций ТТГ (0; 0,15–50) мМЕ/л (точные значения концентраций ТТГ указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 7 флаконов по 1,0 мл. Калибровочные пробы ТТГ откалиброваны относительно международного стандартного образца WHO IS № 81/565 (NIBSC, Великобритания);
- контрольные сыворотки КС1 и КС2 – жидкие препараты из объема по 1 мл (1,0±0,1), содержащие известные количества ТТГ (диапазоны концентраций ТТГ указываются на этикетках), 2 флакона;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- концентрат промывочного раствора (КПР), жидкий препарат, 1 флакон, 25 мл.

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

2.3 Продолжительность анализа 2 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций ТТГ (0,02-50) мМЕ/л.

2.5 Принцип работы набора основан на методе твердофазного двухсайтового иммунорадиометрического анализа (ИРМА).

В наборе используется два вида моноклональных антител к различным эпитопам молекулы ТТГ.

Калибровочные или исследуемые образцы инкубируют в пробирках с иммобилизованным первым моноклональным антителом в присутствии второго моноклонального антитела, меченного йодом-125.

Тиреотропный гормон, присутствующий в сыворотке крови человека, связывается с иммобилизованными на стенках пробирок моноклональными антителами к ТТГ. С ТТГ связываются и меченные [^{125}I]-моноклональные антитела к ТТГ.

После инкубации содержимое пробирок удаляют. Не связавшиеся с иммобилизованным комплексом антитело-ТТГ меченые антитела удаляют с помощью промывки пробирок и измеряют связанную активность [^{125}I].

Концентрацию ТТГ в неизвестных образцах, прямо пропорциональную измеренной скорости счета, находят по калибровочному графику зависимости связанной активности [^{125}I] носителя от концентрации ТТГ в калибровочных пробах.

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.

При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее – РВ) согласно требованиям Санитарных норм и правил «Требования к радиационной безопасности», Гигиенического норматива «Критерии оценки радиационного воздействия», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.12.2012 г. № 213, с дополнением, утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.12.2013 г. № 137.

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.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные крови, которые следует

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать гемоконтактные инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [2], [3], [4], [5]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [6].

Б.3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

Б.3.5 Все радиоактивные отходы, образованные в процессе использования набора собираются, хранятся и удаляются в соответствии с требованиями [8].

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

4.2 Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания, не пригодны для анализа.

4.3 Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- температура в помещении, где проводится анализ, должна быть (18-25) °С;
- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- не допускается использование реагентов с нарушением герметичности упаковки;
- использовать только новые наконечники для внесения каждого образца и реагента;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- гамма-счетчик колодезного типа, позволяющий измерять активность изотопа [^{125}I];
- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- вихревой смеситель;
- водоструйный насос;
- магнитная мешалка;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,02 до 5,00 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- пробирки пластмассовые вместимостью (3-5) мл с пробками;
- штатив для пробирок;
- колба плоскодонная вместимостью 500 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная или деионизованная;
- перчатки хирургические резиновые;
- дезинфицирующие средства.

6 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

6.1 Образцы сывороток крови, в том числе полученных с помощью активатора свертывания крови (в комплексе с разделяющим гелем или без него), могут храниться до анализа не более трех суток при температуре (2-8) °С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре ниже минус 20 °С в течение трех месяцев, при температуре минус 70 ^{0}С – в течение двух лет. Не использовать сыворотки, которые замораживались/размораживались более двух раз.

6.2 Размораживание образцов сывороток проводить при температуре (18-25) °С. Образцы тщательно перемешать пипетированием в течение не менее 1 мин для достижения однородности.

6.3 Образцы, содержащие агрегаты и осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 1900 g (2500-3000 об/мин).

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

7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1 Перед использованием выдержать компоненты набора и анализируемые образцы сывороток крови при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

7.2 Хранение реагентов после вскрытия упаковки

Флаконы с реагентами закрывать крышками 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.

7.3 Приготовление промывочного раствора (разведение в 20 раз)

Внести в колбу плоскодонную вместимостью 500 мл с помощью мерного цилиндра 475 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

концентратом промывочного раствора и тщательно перемешать на магнитной мешалке.

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

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к ТТГ маркировать следующим образом (в дубликатах):

B_0-B_6 – для калибровочных проб ТТГ;

$B_{КС1}$ и $B_{КС2}$ – для КС1 и КС2;

B_X – для исследуемых проб сыворотки крови человека.

8.2 В пробирки B_0-B_6 внести по 0,1 мл (100 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $B_{КС1}$ и $B_{КС2}$ внести по 0,1 мл (100 мкл) контрольных сывороток КС1 и КС2. В пробирки B_X внести по 0,1 мл (100 мкл) исследуемых сывороток крови человека.

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

8.4 Содержимое пробирок инкубировать в течение 1 ч при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок при температуре (18-25) °С.

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

8.6 Во все пробирки внести по 2 мл промывочного раствора (п.7.3). 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.

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

8.8 Последовательность операций анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1

<table>
<tr><td rowspan="2">Пробирки (в дубликатах)</td><td colspan="5">Последовательность операций</td></tr>
<tr><td>Калибровочные пробы, КС1 и КС2, исследуемые сыворотки крови человека, мл</td><td>[^{125}I]-моноклональные антитела к ТТГ, мл</td><td>Инкубировать 1 ч при постоянном встряхивании при температуре (18-25) °С</td><td>Тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса</td><td>Промывочный раствор мл</td><td>Сразу удалить промывочный раствор с помощью водоструйного насоса. Повторить стадию промывки.</td></tr>
<tr><td>B_0-B_6</td><td>0,1</td><td>0,1</td><td rowspan="3">при температуре (18-25) °С</td><td rowspan="3">водоструйного насоса</td><td>2</td><td rowspan="3">промывки.</td></tr>
<tr><td>$B_{КС1}$
$B_{КС2}$</td><td>0,1
0,1</td><td>0,1
0,1</td><td>2</td></tr>
<tr><td>B_X</td><td>0,1</td><td>0,1</td><td>2</td></tr>
<tr><td colspan="7">Измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин</td></tr>
</table>

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

9.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [^{125}I] для каждой пары пробирок, в имп/мин. Из полученных значений скоростей счета вычесть среднее арифметическое значение скорости счета в пробирках B_0.

9.2 Рассчитать величину $(Bi-B_0)/(B_6-B_0)\times100$, в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки крови человека, где Bi – среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках B_1-B_6, $B_{КС1}$, $B_{КС2}$ и B_X.

9.3 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения $((B_i-B_0)/(B_6-B_0))\times100$, в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций ТТГ, в мМЕ/л, в соответствующих калибровочных пробах.

9.4 Определить по калибровочному графику содержание ТТГ, в мМЕ/л, в КС1 и КС2, исследуемых образцах сыворотки крови человека.

10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

10.1 Чувствительность

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

10.2 Специфичность

Моноклональные антитела, используемые в наборе, обладают высокой специфичностью к ТТГ.

При выполнении анализа 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.HAMA), 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.

10.3 Воспроизводимость результатов

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

10.4 Тест на «открытие»

Соответствие значений измеренной и расчетной концентраций ТТГ в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки КС1 и калибровочной пробы C_3 составляет (90-110) %.

10.5 Тест на «линейность»

Соответствие значений измеренной и расчетной концентраций ТТГ в пробах, полученных при разведении КС1 и КС2 в 2, 4, 8 раз и при умножении на коэффициент разведения составляет (90-110) %.

10.6 Клиническая проверка набора

При использовании набора ИРМА-ТТГ-СТ получены следующие диапазоны концентраций ТТГ в сыворотках крови:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

Приведенные значения являются ориентировочными. Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций ТТГ, соответствующие норме для обследуемого контингента и региона.

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

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1 Набор должен храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

11.2 Срок годности набора – 45 суток.

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

Образцы сыворотки крови хранят при температуре (2-8) °С, если анализ проводят в течение 24 ч после взятия крови. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре не менее минус 20 °С в течение более длительного времени – не более 3 месяцев (допускается только двукратное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru