

Набор чТГ [I-125] IRMA (Номер по каталогу: RK-51CT)

Система ^{125}I -чТГ IRMA позволяет проводить прямое количественное определение человеческого тиреоглобулина (чТГ) *in vitro* в сыворотке крови человека. Количественное определение чТГ может проводиться в диапазоне 0-250 нг/мл, при этом используются образцы сыворотки объемом 100 мкл.

Введение

Тиреоглобулин (ТГ) является йодогликопротеином, состоящим из гетерогенных молекул, состав которых частично зависит от степени йодирования. Превалирует молекулярная форма массой 660 кДа (димер, состоящий из 2 субъединиц, связанных нековалентными связями), но в щитовидной железе существуют как более крупные, так и более мелкие молекулы. ТГ является местом синтеза и хранения гормонов, вырабатываемых в щитовидной железе. ТГ синтезируется и хранится в фолликулах щитовидной железы, при этом при стимуляции тиреотропином (ТТГ) совместно с тироксином (Т4) и трийодтиронином (Т3) некоторая часть неферментативно расщепленного белка поступает в кровоток.

Определение ТГ методами иммунного анализа играет ключевую роль в диагностике таких заболеваний щитовидной железы как многоузловой зоб (болезнь Грейвса), доброкачественная аденома щитовидной железы, тиреоидиты (острая фаза) и дифференцированная карцинома. Также данный метод является полезным средством мониторинга пациентов после облучения на предмет наличия риска развития карциномы щитовидной железы. Чувствительность данной системы чТГ IRMA позволяет определять субнормальные концентрации чТГ, что является ранним и достоверным маркером рецидива опухоли.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоаффинных моноклональных антител. Сигнальное антитело, меченное ^{125}I , связывается с эпитопом молекулы ТГ, которая пространственно отличается от молекулы, которая распознается биотин-захватывающим антителом. Два указанных антитела одновременно реагируют с антигеном, который содержится в стандартах и в образцах сыворотки, что приводит к образованию комплекса захватывающее антитело – антиген – сигнальное антитело, который также называется «сэндвич».

Во время периода инкубации продолжительностью более 12 часов иммунный комплекс иммобилизуется на реакционной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционная смесь сливается, пробирки тщательно промываются с последующим определением радиоактивности в гамма-счетчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна уровню радиоактивности в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество чТГ, может быть определена искомая концентрация чТГ в образцах пациента.

Содержимое набора

- 1 флакон МЕТКИ (21 мл), готовой к использованию, содержит приблизительно 980 кБк ^{125}I -анти-чТГ и захватывающего анти-чТГ в буфере с красным красителем 0,1% NaN_3 .
- 6 флаконов СТАНДАРТОВ (6 x 1.0 мл), содержащие (S1-S6) 0.3, 1.0, 4.0, 20, 100, 250 нг/мл чТГ (откалиброванных по BCR CRM457) в сыворотке с 0,1% NaN_3 .
- 2 флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ, с 0,1% NaN_3 . Концентрация контрольной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества.
- РАСТВОР ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ СЫВОРОТКИ, 5.0 мл, содержит 0,1% NaN_3 .

5. ВОССТАНОВЛЕННАЯ СЫВОРОТКА, 1.0 мл, содержит 0,1% NaN_3 . Концентрация восстановленной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества.

6. 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2x50 реакционных пробирок, 12x75 мм, упакованных в пластиковые коробки.

5. 1 флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащего 0.2% NaN_3 . См. *Приготовление реактивов*.

Сертификат качества

Листок-вкладыш

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, высокоточные пипетки с одноразовыми наконечниками (100, 200 и 2000 мкл), вихревой перемешиватель, шейкер, полимерная пленка, абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

Пипетки для серийных впрыскиваний (напр., Эппендорф и др.), диспенсер с резервуаром (вместо пипетки объемом 2 мл)

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть приготовлены согласно общепринятым методикам, которые рутинно используются в клинической лабораторной практике. Если исследование проводится в течение 24 часов, образцы могут храниться при температуре от 2°C до 8°C. В иных случаях аликвоты должны приготавливаться и храниться в условиях глубокого замораживания (-20°C). Перед использованием замороженные образцы должны быть разморожены и тщательно перемешаны. Следует избегать повторного замораживания/оттаивания. Запрещается использовать липемичные, гемолизированные и мутные образцы. Образцы, в которых концентрация чТГ выше, чем в стандарте с максимальной концентрацией, должны разводиться и подвергаться повторному количественному определению.

Приготовление и хранение реактивов

Добавить концентрат промывочного буфера (20 мл) к 700 мл дистиллированной воды для получения 720 мл промывочного раствора. После разведения хранить раствор при температуре от 2°C до 8°C до окончания срока годности.

После вскрытия хранить реактивы при температуре от 2°C до 8°C. При такой температуре каждый реактив остается стабильным до окончания срока годности. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества.

ВНИМАНИЕ!

Необходимо уравновесить все реактивы и образцы сыворотки до комнатной температуры. Перед использованием тщательно перемешать все реактивы и образцы. Избегать чрезмерного пенообразования.

Тест восстановления

Анти-ТГ антитела, а также неспецифические эффекты в сыворотке крови пациента могут оказывать влияние на точность определения уровня тиреоглобулина, что может привести к недооценке концентрации ТГ при использовании системы IRMA. Такое воздействие может быть выявлено с помощью теста восстановления. Тест восстановления должен проводиться в соответствии с методикой, описанной в процедуре количественного определения.

Концентрация восстановленной сыворотки (приблизительно 500 нг ТГ/мл) должна проверяться раствором для разведения сыворотки (пробирки для эталонного восстановленного раствора (DR)).

Восстановление (в %) в образце сыворотки:

$$\frac{\text{нг ТГ/мл } R_x - \text{нг ТГ/мл } S_x}{\text{нг ТГ/мл DR}} \times 100 = \% \text{ восстановления}$$

Восстановление в диапазоне от 70% до 130% считается допустимым. Уровни <70% и >130% могут быть обусловлены описанным воздействием, а уровень ТГ соответствующего исходного образца должен рассматриваться как недостоверный.

Подсчитать радиоактивность (60 сек/пробирка)
Рассчитать результаты

Процедура количественного определения

(Для краткого описания см. Таблицу 1.)

- 1) Перед использованием уравновесить все реактивы и образцы до комнатной температуры.
- 2) Промаркировать в двух экземплярах пробирки с покрытием для каждого стандарта (S1-S6), контрольной сыворотки (CI, CII), раствора для разведения сыворотки (D) в качестве нулевого калибратора, эталонного восстановленного раствора (DR), образцов сыворотки (S_x) и восстановленной сыворотки (R_x).
- 3) Аккуратным перемешиванием гомогенизировать все реактивы и образцы. Избегать чрезмерного пенообразования.
- 4) С помощью пипетки поместить по 10 мкл восстановленной сыворотки в пробирки с эталонным восстановленным раствором (DR) и в пробирки с образцами восстановленного раствора (R).
- 5) С помощью пипетки поместить по 100 мкл стандартов (S1-S6), 100 мкл контроля в контрольные пробирки (CI, CII), 100 мкл образца в пробирки для образца (S) и восстановленной сыворотки (R) и 100 мкл раствора для разведения сыворотки в пробирки для эталонного восстановленного раствора (DR) и в пробирки для раствора для разведения сыворотки (D) в качестве нулевого калибратора. Для удержания пробирок использовать штатив. Не дотрагиваться и не царапать внутреннюю поверхность пробирок наконечником пипетки.
- 6) С помощью пипетки поместить в каждую пробирку по 200 мкл метки.
- 7) Аккуратно перемешать содержимое всех пробирок. Запечатать все пробирки пластиковой пленкой.
- 8) Инкубировать пробирки в течение 15-24 часов при температуре 25°C.
- 9) Добавить 2.0 мл разведенного промывочного буфера в каждую пробирку и слить супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. На 2 минуты поместить штатив на адсорбирующую бумагу в перевернутом состоянии.
- 10) Вернуть штатив с пробирками в исходное положение и еще дважды повторить Этап 9.
- 11) Определить радиоактивность каждой пробирки в гамма-счетчике в течение как минимум 60 секунд.
- 12) Рассчитать концентрацию ТГ в образцах в соответствии с методикой, описанной в разделе «Расчет результатов», либо с использованием специального программного обеспечения.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения (все объемы указаны в мкл)

Пробирки Реактивы	Всего (Т)	Раство р для разведе ния сыворо тки (D)	Станда рты (S1-S6)	Образе ц (S _x)	Пробир ки для восстан овленн ого сыворо тки (R _x)	Пробир ки для восстан овленн ого раствор а (DR)	Контро льная сыворо тка (CI- CII)
Стандарт			100				
Образец				100	100		
Контрольная сыворотка							100
Восстановлен ная сыворотка					10	10	
Раствор для разведения сыворотки		100				100	
Метка	200	200	200	200	200	200	200
Инкубировать пробирки при температуре 25°C в течение 15-24 часов							
Промыво чный буфер	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Слить жидкость и высушить пробирки на фильтровальной бумаге							
Повторить этап промывания дважды							

Расчет результатов

Расчет результатов представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2.

Рассчитать среднее значение в минуту (CPM) для каждой пары исследуемых пробирок.

Рассчитать нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контроля и образца, соответственно, с использованием следующей формулы:

$$B/T(\%) = \frac{S1 - 6 / C / Sx / Rx (cpm) - D}{T(cpm)} \times 100$$

На полулогарифмической бумаге построить график В/Т (%) для каждого стандарта против соответствующей концентрации ТГ.

Определить концентрацию ТГ в неизвестных образцах путем интерполяции стандартной кривой. Не рекомендуется экстраполировать значения, выходящие за пределы диапазона стандартной кривой.

При отсутствии программного обеспечения для аппроксимации в ходе компьютерной обработки данных, могут использоваться логит-логарифмические и сплайновые методы аппроксимации. Также доступны системы автоматической обработки данных.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	ТГ нг/мл	Значени е срм 1	Значени е срм 2	Среднее значение срм	ТГ нг/мл
T	-	393128	394123	393626	-
D (HCC)	0	167	178	171	-
S _{0.3}	0.3	552	559	556	-
S _{1.0}	1.0	1448	1476	1462	-
S _{4.0}	4.0	5517	5500	5509	-
S ₂₀	20	24756	24712	24734	-
S ₁₀₀	100	90031	90207	90119	-
S ₂₅₀	250	158821	162358	160590	-
CI	-	2458	2502	2480	1.99
CII	-	70250	70511	70380	69.8

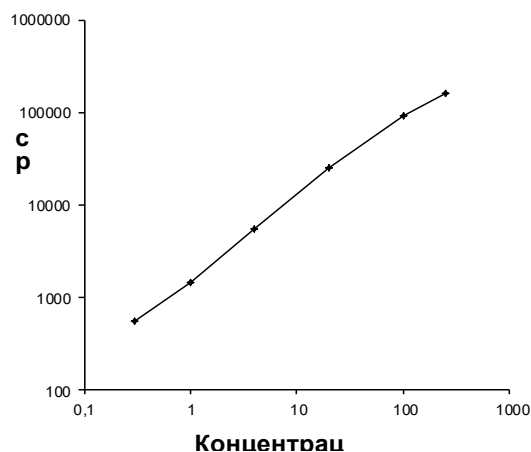


Рисунок 1: Типичная стандартная кривая

(Не использовать для расчета значений неизвестных образцов)

Характеристика количественного определения

Чувствительность

Аналитическая чувствительность или нижняя граница определения рассчитывается путем интерполяции средних значений счета нулевого стандарта стандартной кривой плюс 2 среднеквадратичных отклонения. Определение проводилось с использованием 20 копий ответа нулевого стандарта.

При использовании свежей метки аналитическая чувствительность составляет **0.03** нг/мл.

Функциональная чувствительность определялась на основании точного профиля, полученного в результате 20 независимых исследований на образцах с низкой концентрацией, выполненных дважды. При использовании свежей метки функциональная чувствительность составляет **0.1** нг/мл.

Эффект крючка

При концентрациях чТГ до 20000 нг/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствует.

Линейность – тест разведения

Три индивидуальных образца человеческой сыворотки разводились с помощью нулевого стандарта, входящего в состав набора. Оценка разведенных образцов производилась в соответствии с протоколом набора.

№ образца	Коэфф. разведения	Ожидаемое, нг/мл	Наблюдаемое, нг/мл	Восстановление, %
1		68.5	68.5	
1	2	34.0	34.3	101.0
1	4	16.7	17.0	101.6
1	8	8.2	8.3	101.0
1	16	4.1	4.2	104.2
2		93.6	93.6	
2	2	46.4	45.2	97.5
2	4	22.9	22.0	96.3
2	8	11.3	10.7	95.2
2	16	5.6	5.3	95.2
3		67.5	67.5	
3	2	33.6	31.8	94.7
3	4	16.6	15.4	93.0
3	8	8.2	7.5	92.3
3	16	4.0	3.7	93.0

Восстановление – тест добавления

49 индивидуальных образцов человеческой сыворотки обогащались исходным раствором известной концентрации, содержащим сыворотку. Данный раствор был приготовлен в различных количествах из BCR-сертифицированного эталонного препарата 457. Полученные результаты представлены ниже в виде таблицы.

	Базовая концентрация образца (нг/мл)	Концентрация с восстановлением образца (нг/мл)	Восстановление %
Образец 1	6,9	60,6	101
Образец 2	15,5	69,9	103
Образец 3	99,5	152,6	100
Образец 4	2,3	58,8	107
Образец 5	10,4	63,5	100
Образец 6	57,3	109,0	97
Образец 7	6,5	62,0	105
Образец 8	7,0	61,0	102
Образец 9	2,5	52,8	95
Образец 10	106,0	159,4	101
Образец 11	32,4	83,8	97
Образец 12	7,4	60,8	101
Образец 13	41,0	88,2	89
Образец 14	8,8	63,9	104
Образец 15	0,9	56,9	106
Образец 16	12,9	61,0	91

Образец 17	0,3	51,1	96
Образец 18	6,2	61,3	104
Образец 19	3,9	58,7	103
Образец 20	2,0	51,6	94
Образец 21	3,4	52,2	92
Образец 22	3,3	55,7	99
Образец 23	43,9	91,8	90
Образец 24	10,1	62,7	105
Образец 25	8,6	62,9	109
Образец 26	0,6	36,8	72
Образец 27	0,3	54,8	109
Образец 28	11,4	52,3	82
Образец 29	10,3	63,8	107
Образец 30	7,9	64,5	113
Образец 31	0,6	57,2	113
Образец 32	33,3	76,3	86
Образец 33	5,0	64,8	120
Образец 34	11,5	68,3	114
Образец 35	22,9	71,0	96
Образец 36	2,3	50,4	96
Образец 37	7,9	53,9	92
Образец 38	0,5	39,5	78
Образец 39	5,4	48,2	86
Образец 40	17,2	73,7	113
Образец 41	190,8	235,4	89
Образец 42	77,5	132,1	109
Образец 43	5,1	61,5	113
Образец 44	23,1	66,2	107
Образец 45	76,4	119,4	107
Образец 46	4,7	47,2	106
Образец 47	154,2	199,1	112
Образец 48	2,3	44,2	104

Внутри- и межсубъектная вариабельность

Межсубъектная вариабельность		Внутрисубъектная вариабельность	
Среднее значение (нг/мл)	CV %	Среднее значение (нг/мл)	CV %
11,4	1,8	11,5	2,2
118,7	1,9	117,8	2,7
85,4	2,2	86,2	1,9
5,9	2,6	6,0	1,7
4,9	2,0	5,1	2,0
1,3	2,7	1,3	3,0
0,7	5,9	0,7	6,3

Ожидаемые значения

Диапазон ожидаемых нормальных значений составляет 2 нг/мл – 70 нг/мл.

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определяла собственный диапазон эталонных значений для здоровых людей в данной популяции пациентов, так как данные показатели могут отличаться в различных лабораториях и различных регионах.

Примечания к методике

- Источник ошибки!** Пробирки, упакованные в пластиковые коробки, индивидуально не промаркированы. Необходимо

следить за тем, чтобы они не перемешивались с обычными пробирками. Для минимизации риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо для проведения исследования, а после выполнения работы класть их обратно в коробку. Пробирки для количественного определения рекомендуется помечать маркером.

- 2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения пробирки должны быть плотно закреплены в штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное встряхивание может стать причиной низкой эффективности количественного определения.
- 3) **Добавление промывочного буфера.** Для добавления промывочного буфера рекомендуется использование обычного лабораторного диспенсера со стеклянной емкостью объемом 1 л и гибкого выпускника для пробирки. При отсутствии данного оборудования можно использовать шприц большого объема, соединенный с пипеткой для серийного введения.

Дополнительная информация

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил по использованию радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, которые используются в наборе, были получены от здоровых доноров. Они были подвергнуты индивидуальным исследованиям с использованием утвержденных методов (иммуоферментный анализ), по результатам которых были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1, 2), антител к вирусу гепатита С (анти-НСV), поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg) и антирепемных антител.

При работе с образцами, полученными от человека, которые подлежат исследованию с использованием диагностических наборов, необходимо всегда соблюдать осторожность. Даже если пациент прошел необходимые обследования, ни один из методов не может дать полной гарантии отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека необходимо обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Все продукты животного происхождения и их производные были получены от здоровых животных. Тем не менее вещества животного происхождения должны расцениваться как потенциально инфекционно опасный материал.

Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты набора содержат азид натрия. При утилизации отходов их необходимо смывать большим количеством воды для предотвращения накопления взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Общее содержание азидов в каждой упаковке составляет 76 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C.

Срок годности: 67 дней с момента готовности.

Литература

1: Feldt-Rasmussen U et al. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1996;54(10-11):337-42. *Human thyroglobulin reference material (CRM 457). 1st Part: Assessment of homogeneity, stability and immunoreactivity.*

2: Feldt-Rasmussen U et al. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1996;54(10-11):343-8. *Human thyroglobulin reference material (CRM 457). 2nd Part: Physicochemical characterization and certification.*

3: Van Herle AJ, Van Herle IS, Greipel MA. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985 Feb;60(2):338-43. *An international cooperative study evaluating serum thyroglobulin standards.*

4: Feldt-Rasmussen U, Schlumberger M. *J Endocrinol Invest*. 1988 Mar;11(3):175-81. *European interlaboratory comparison of serum thyroglobulin measurement.*




5: Spencer CA, Platler BW, Nicoloff JT. *Clin Chim Acta*. 1985 Dec 13;153(2):105-15. *The effect of [125I]thyroglobulin tracer heterogeneity on serum Tg RIA measurement.*

6: Ferrari L et al. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2004 Sep;48(3):237-42. *Comparative evaluation of two methods to assay thyroglobulin serum concentrations in patients with differentiated thyroid carcinomas.*

7: Spencer CA et al. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Oct;90(10):5566-75. *Epub 2005 Jun 28. Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas.*

8: Morgenthaler NG et al. *Clin Chem*. 2002 Jul;48(7):1077-83. *Technical evaluation of a new immunoradiometric and a new immunoluminometric assay for thyroglobulin.*

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Использовано		Контроль
	Номер партии		Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность		Метка
	Обратитесь к инструкции по использованию		Промывочный буфер
	Устройство для проведения диагностики in vitro		Раствор для разведения сыворотки
	Производитель		Восстановленная сыворотка
REF	Номер по каталогу		Температурное ограничение Хранить при температуре 2-8°C
	Радиоактивный материал		
			

Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES CO. LTD.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Тел.: (36-1)392-2577,

Факс: (36-1)395-9247

Обновлено: 01.09.2017