

Набор ТурбоТТГ [I-125] IRMA

(Номер по каталогу: RK-1CT1)

Система ^{125}I -чТТГ IRMA предназначена для прямого количественного определения *in vitro* человеческого тиреотропного гормона (чТТГ) в сыворотке крови в диапазоне 0-100 мкМЕ/мл с использованием образцов сыворотки 100 мкл.

Введение

Тиреотропный гормон (ТТГ) представляет собой гликопротеин с молекулярным весом 28000, который вырабатывается аденогипофизом. Подобно другим гликопротеиновым гормонам (ФСГ, ЛГ, ХГ), ТТГ состоит из двух различных субъединиц, α - и β -цепей, связанных нековалентными связями. чТТГ и другие гонадотропины имеют одинаковую первичную структуру α -субъединиц, в то время как их β -субъединицы различаются. β -субъединицы отвечают за иммунологическую и биологическую специфичность этих гормонов.

Синтез и высвобождение чТТГ контролируются уровнем циркулирующих тиреоидных гормонов: трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4), а также гипоталамическим тиротропин-рилизинг гормоном (ТРГ). Тиреоидные гормоны регулируют секрецию чТТГ с помощью механизма отрицательной обратной связи. Увеличение уровня T_3 и T_4 подавляет, а их снижение, наоборот, увеличивает уровень чТТГ в сыворотке крови. Увеличение концентрации чТТГ в сыворотке крови является самым ранним и наилучшим признаком первичного гипотиреоза.

Определение уровня чТТГ методами иммунологического анализа играет ключевую роль в диагностике заболеваний щитовидной железы и в оценке функциональной целостности гипоталамо-гипофизарной системы.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоаффинных моноклональных антител.

^{125}I -меченые сигнальные антитела связываются с эпитопом молекулы чТТГ, которая пространственно отличается от молекулы, которая распознается биотин-захватывающим антителом. Два типа антител одновременно взаимодействуют с антигеном, присутствующим в стандартах или образцах, что приводит к образованию комплексов захватывающее антитело – антиген – сигнальное антитело, также называемых «сэндвич».

Во время инкубации иммунокомплексы оседают на реактивной поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционная смесь удаляется, пробирки тщательно промываются с последующим определением радиоактивности в гамма-счетчике.

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

Содержимое набора

1. 1 флакон МЕТКИ, готовой к использованию. 12 мл во флаконе, содержит < 980 кБк ^{125}I -сигнальных и захватывающих антител в буфере с красным красителем и 0,1% NaN_3 .

2. 8 флаконов СТАНДАРТОВ (8 x 1.0 мл), содержащих 0 (S_0), 0,06 ($S_{0,06}$), 0,15 ($S_{0,15}$), 0,6 ($S_{0,6}$), 2,5 ($S_{2,5}$), 15 (S_{15}), 50 (S_{50}) и 100 (S_{100}) мкМЕ/мл чТТГ (ВОЗ Зрд IRP 81/565) в лошадиной сыворотке с 0,1% NaN_3 .

3. 2 флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (2 x 1.0 мл) низкой (СI) и высокой (СII) концентрации. Сыворотка человека, содержащая 0,1% NaN_3 .

Концентрации контрольных сывороток указаны в прилагаемом сертификате качества.

4. 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2x50 пробирок, 12x75 мм, упакованных в пластиковые коробки.

Сертификат качества

Листок-вкладыш

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными

наконечниками (100 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревой смеситель, шейкер, полимерная пленка, абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

Высокоточные автоматические пипетки (напр., Eppendorf и др.), диспенсер с резервуаром объемом 1 л (вместо 2 мл пипетки)

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °С, если исследование проводится в течение 24 часов. В иных случаях аликвоты должны приготавливаться и храниться в условиях глубокого замораживания (-20°С). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать. Следует избегать повторного замораживания / оттаивания. Не следует использовать образцы липемической, гемолизной или мутной сыворотки.

Хранение реактивов

Открытые образцы реактивов следует хранить при температуре 2-8°С. При такой температуре каждый реактив остается стабильным до окончания срока годности набора. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества.

ВНИМАНИЕ!

Перед началом процедуры анализа все реагенты и образцы сыворотки должны достичь комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты и образцы перед использованием. Избегайте образования пены.

Процедура количественного определения

Примечание: Если до окончания срока годности набора осталось менее 3 недель, либо при использовании автоматической процедуры, не следует использовать стандарт 0.06 мкМЕ/мл.

1. Промаркируйте в двух экземплярах пробирки с покрытием для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образцов.

2. С помощью пипетки поместите по 100 мкл каждого стандарта,

контрольной сыворотки и образцов в предварительно промаркированные пробирки. Используйте подставку для пробирок. Не касайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность и дно пробирок наконечником пипетки.

3. С помощью пипетки поместите в каждую пробирку по 100 мкл метки. (При желании, отложите 2 пробирки без покрытия для подсчета общей радиоактивности).

4. Закройте все пробирки полимерной пленкой. Прочно зафиксируйте штатив в шейкере. Включите шейкер и настройте его скорость таким образом, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась или перемешивалась (рекомендуется мин. 600 об/мин).

5. Инкубируйте пробирки в течение 30 минут, перемешивая при комнатной температуре.

6. Добавьте 2,0 мл дистиллированной воды в каждую пробирку. Слейте или аспирируйте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. На 2 минуты поместите штатив в перевернутом состоянии на фильтровальную бумагу.

7. Верните штатив с пробирками в вертикальное положение и повторите шаг 6 ещё 2 раза.

8. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик как минимум на 60 секунд.

9. Рассчитайте концентрации чТТГ в образцах, как описано в разделе Расчет результатов или с помощью специального программного обеспечения.

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

Пробирки	Всего	Стандарт	Контроль	Образец
Стандарт		100		
Контроль			100	
Образец				100
Метка	(100)	100	100	100
Перемешивать в течение 30 минут при комнатной температуре				
Трижды промыть пробирки 2 мл дистиллированной воды				
Измерить радиоактивность (60 сек на пробирку)				
Рассчитать результаты				

Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные количественного определения должны быть схожими с теми, которые представлены в Таблице 2.

Рассчитайте среднее значение в минуту (срм) для каждой пары исследуемых пробирок.

Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контроля и образца, используя следующую формулу:

$$В/Т \% = \frac{Sx/C/Mx/ (срм) - S0(срм)}{T (срм)} \times 100$$

Используя логарифмическую бумагу нанесите на график значения В/Т (%) каждого стандарта по одной оси и соответствующие им концентрации чТТГ по другой.

Определите концентрацию чТТГ контрольных и неизвестных образцов путём интерполяции со стандартной кривой.

Также доступны системы автоматической обработки данных.

Таблица 2. Типичные результаты количественного определения

Пробирки	Среднее срм	В/Т%
Всего	375646	
S0 (NSB)	160	
S0.06	275	0.03
S0.15	462	0.08
S0.6	1233	0.29
S2.5	4899	1.26
S15	26309	6.96
S50	79850	21.21
S100 (Bmax)	150083	39.91
CI	1991	0.49
СИ	31386	8.31

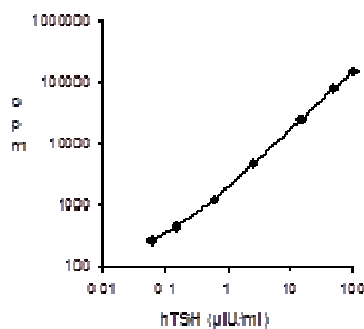


Рисунок 1.

Типичная калибровочная кривая (Не использовать для расчёта результатов количественного определения!)

Характеристика количественного определения

Чувствительность

Аналитическая чувствительность составляет **0,009 мкМЕ/мл**, полученная на основании данных 31 повторных определений нулевого стандарта. Чувствительность определялась как концентрация, соответствующая сумме средних значений срм и двойное стандартное отклонение.

Предел холостого образца (LoB), предел обнаружения (LoD), предел количественного определения (LoQ) были определены в соответствии с руководствами CLSI документ EP17.

Предел холостого образца (LoB) = 0,015 мкМЕ/мл определяется как наибольшее значение измерения, которое можно получить (с установленной вероятностью 5%) для холостого раствора.

Предел обнаружения (LoD) = 0,036 мкМЕ/мл определяется с соотношением ложноположительных результатов (α) менее 5% и ложноотрицательных результатов (β) менее 5% на основании результатов 116 количественных определений с 4 холостыми растворами и 4 образцами с низкой концентрацией.

Предел количественного определения (LoQ) = 0,070 мкМЕ/мл определяется графически по калибровочной кривой. LoQ = функциональная чувствительность.

Точность и воспроизводимость

Образцы, полученные от 5 пациентов, были проанализированы в 20 повторных измерениях для определения точности в ходе количественного определения. Полученные значения представлены ниже:

Образец	Среднее значение (мкМЕ/мл)	CV %
1	1.91	1.85
2	2.37	2.41
3	8.39	1.19
4	19.84	1.68
5	45.86	1.21

Для определения точности между количественными определениями были протестированы 7 образцов сывороток пациентов дважды в 20 независимых анализах, выполненных 6 операторами, с использованием наборов различных партий. Полученные значения приведены ниже.

Образец	Среднее значение (мкМЕ/мл)	CV %
1	0.076	19.3
2	0.152	11.5
3	2.149	3.0
4	2.249	3.5
5	7.531	2.6
6	18.939	2.7
7	38.489	2.0

Линейность – Тест разведения

Исследование 4 образцов сыворотки человека проводилось в серии разведений с нулевым стандартом. Измерение проводилось в соответствии с протоколом. Среднее значение восстановления после разведения нулевым стандартом составило 95,36%.

Приведенная ниже формула, полученная для измеренной (Y) концентрации в сравнении с ожидаемой (X), указывает на хорошую линейность:

$$y = 1.0361x - 0.7669 \quad R^2 = 0.9994 \quad n = 16$$

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение ожидаемого повышения пиков образцов сыворотки в процентном выражении при известном количестве ТТГ. Средний уровень восстановления для 4 партий сывороток с ТТГ на 3 уровнях был 102,28% с диапазоном от 99% до 108%.

Эффект крючка

При концентрациях чТТГ 8000 мкМЕ/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствует.

Специфичность

При нормальном физиологическом уровне не выявляется перекрестной реактивности с ЛГ, ФСГ и ХГ.

Референтные значения

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определяла собственный диапазон референтных значений. Представленные ожидаемые значения получены при тестировании здоровых доноров крови. Образцы были исследованы дважды.

Диапазон референтных значений для здоровых лиц составляет **0.30 - 4.00 мкМЕ/мл.**

Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Пробирки для проведения реакции упакованы в пластиковые коробки и не промаркированы индивидуально. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не перепутать их с обычными пробирками. Для минимизации риска ошибки не берите из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо. Неиспользованные пробирки, оставшиеся после работы, положите обратно в коробку. Пробирки, используемые для анализа, рекомендуется пометить маркером.

2) **Примечание к этапу перемешивания:** Для обеспечения эффективного вращения, пробирки следует плотно установить на штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное встряхивание может стать причиной низкой эффективности количественного определения.

3) **Декантация:** Декантация (сливание жидкости) является наиболее критическим этапом процедуры количественного определения. Обратите особое внимание на то, чтобы не загрязнить внешнюю поверхность пробирок, переворачивая тестируемый штатив с пробирками. Даже небольшое загрязнение может сопровождаться появлением неопределенного фона, который станет причиной существенно завышенной оценки концентрации. Подобная ошибка может быть особенно значимой при низком уровне концентрации, что имеет чрезвычайно важное значение для достоверного определения субнормальных величин ТТГ. По той же причине необходимо проведение регулярных проверок состояния аппаратуры и инструментария. Это особенно важно при использовании многоканальных счётчиков. Убедитесь, что фоновые значения и вариации между отдельными каналами находятся в пределах допустимого диапазона, указанного в сервисной книге счётчика.

Дополнительная информация: Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий набора или наборов, выпускаемых разными производителями.

Ограничения

- Несоблюдение данной инструкции может значительно повлиять на результаты исследования.
- Результаты исследования следует интерпретировать в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез заболевания, а также данные дополнительных методов исследования и прочих диагностических процедур.
- Образцы крови пациентов, получавших в диагностических или терапевтических целях мышинный иммуноглобулин, могут содержать человеческие анти-мышинные антитела (ЧАМА). Исследование сыворотки крови таких пациентов может приводить к получению ошибочных результатов.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный набор содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов и правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (ИФА, иммуноферментный анализ). В результате проверки 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 антирепонеменных антител. Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод

не может гарантировать полного отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Все продукты животного происхождения и их производные были получены у здоровых животных. Тем не менее, части набора, содержащие компоненты животного происхождения, должны рассматриваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.





Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 22 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C

Срок годности: 67 дней с момента готовности.

	Использовать до		Контроль
	Номер партии		Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность		Метка
	Обратитесь к инструкции по использованию		Номер по каталогу
	Устройство для проведения диагностик и in vitro		Температурный предел Хранить при температуре 2-8°C
	Производитель		Радиоактивный материал



Сайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail:

commerce@izotop.hu

IZOTOP

ООО «Институт изотопов»

1535 Будапешт. Pф.: 851.

Тел.: (36-1) 392-2577,

Факс: (36-1) 395-9247