

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) 211-80-19, 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАКТИВОВ ДЛЯ РАДИОИМУНОЛОГИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

РИА-Т₄-свободный

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения
Республики Беларусь
_____ В.П.Руденко
"26" июня 2002 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1. Набор РИА-Т₄-свободный предназначен для количественного определения свободного Т₄ в сыворотке крови человека методом радиоиммунологического анализа.

1.2. Тироксин (Т₄) является гормоном с молекулярной массой около 777, который синтезируется щитовидной железой. В сыворотке крови тироксин связан тремя белками: тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), который связывает 70% Т₄, тироксинсвязывающим преальбумином (ТСПА), связывающим 20% Т₄ и альбумином.

Приблизительно 0,03 % Т₄ циркулирует в крови в не связанном с белками состоянии. Свободный гормон отвечает за биологическую активность. Концентрация свободного Т₄ остается постоянной независимо от уровня связывающих белков и поэтому не изменяется при повышении уровня ТСГ (беременность, употребление эстрогенов и оральных контрацептивов), при понижении уровня ТСГ (при употреблении андрогенов или салицилатов, при нефротическом синдроме), а также при снижении связывающей способности белков.

Таким образом, уровень свободного Т₄ наиболее достоверно отражает статус щитовидной железы. Его повышенная концентрация имеет место при центральном или периферическом гипертиреозе. Снижение уровня свободного Т₄ наблюдается при гипотиреозе.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1. Состав набора:

- [¹²⁵I]-моноклональные антитела к Т₄, общая активность (120-300) кБк, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 45 мл;

- пробирки полистирольные с иммобилизованным авидином, готовы к использованию, 100 шт.;

- пять калибровочных проб на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества свободного Т₄ в диапазоне концентраций (0–75) пмоль/л (точные концентрации свободного Т₄ в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 5 флаконов по 0,5 мл;

- лиганд, готов к использованию, 1 флакон, 12 мл;

- контрольная сыворотка (КС), лиофилизированный препарат, 1 флакон.

2.2. Набор РИА-Т₄-свободный рассчитан на проведение анализа в дубликатах 44 известных проб, 1 пробы КС и 5 калибровочных проб, а также 1 пробы общей активности [¹²⁵I]-моноклональных антител к Т₄, всего 100 определений.

2.3. Принцип метода состоит в следующем. Образцы инкубируются в пробирках с иммобилизованным лигандом, совместно с [¹²⁵I]-моноклональными антителами к Т₄ и биотинилированным аналогом тироксина (лигандом). Свободный тироксин образца вытесняет определенную часть лиганда из его комплекса с антителами. Комплекс "лиганд-антитело" связывается с авидином, иммобилизованным на стенках пробирок. Значение связанной радиоактивности на стенках пробирок обратно пропорционально концентрации свободного тироксина в образце.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1. [¹²⁵I]-моноклональные антитела к Т₄ 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 (РВ) по 3-му классу работ (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. Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,025; 0,1 и 0,4 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

- горизонтальный встряхиватель пробирок (не менее 350 вст/мин);

- штатив для пробирок;

¹²⁵ - гамма-счетчик, позволяющий измерять активность изотопа [¹²⁵I];

- водоструйный насос;

- перчатки резиновые хирургические;

- дистиллированная вода.

5. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

5.1. Перед использованием выдержать компоненты набора при комнатной температуре (18–25) °С в течение (30–40) мин.

5.2. Во флакон с КС внести 0,5 мл дистиллированной воды. Через 10 мин аккуратно перемешать содержимое, избегая образования пены. Хранить при –20 °С до окончания срока годности набора.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Аналитические пробирки поместить в штатив и каждую пару пробирок маркировать обозначением той величины, для измерения которой они предназначены:

В₀ – В₄ – для построения калибровочной кривой;

В_{КС} – для пробирок с КС;

В_х – для исследуемых образцов;

отдельно маркировать две пробирки Т – для определения общей активности [¹²⁵I]-моноклональных антител к Т₄ в пробирке.

6.2. Отобрать из каждого флакона с калибровочными пробами по 0,025 мл сыворотки и внести в пробирки В₀ – В₄. Из флакона с КС отобрать по 0,025 мл и внести в пробирки В_{КС}. В пробирки В_х внести по 0,025 мл анализируемой сыворотки крови пациентов.

Внимание: сразу же после пипетирования, необходимо закрывать флаконы с растворами КС и калибровочными пробами, т.к. может произойти испарение раствора, что приведет к искажению результатов при следующем определении.

¹²⁵ 6.3. Во все пробирки внести по 0,4 мл раствора [¹²⁵I]-моноклональных антител к Т₄.

6.4. Во все пробирки, кроме Т, внести по 0,1 мл раствора лиганда и перемешать.

6.5. Инкубировать все пробирки при температуре (18–25) °С в течение 1,5 ч при постоянном встряхивании (не менее 280 встряхиваний в мин).

6.6. Из всех пробирок, кроме Т, полностью удалить содержимое с помощью водоструйного насоса.

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

6.8. Схема анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1.

Пробирки (в дуб-лика-тах)	Последовательность операций				
	Калибровочные, мл	Контрольная сывотка или исследуемые образцы, мл	[¹²⁵ I]-моноклональные антитела к Т ₄ , мл	Лиганд, мл	Содержимое пробирок инкубировать при температуре (18-25) °С в течение 1,5 ч при постоянном встряхивании.
T	-	-	0,4	-	
V ₀ -V ₄	0,025	-	0,4	0,1	
V _{КС}	-	0,025	0,4	0,1	
V _Х	-	0,025	0,4	0,1	

Из всех пробирок, кроме Т, полностью удалить содержимое. Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [¹²⁵I] в каждой пробирке в течение 1 мин

7. РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1. Найти среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I] для каждой пары пробирок.

7.2. Рассчитать соотношение V₀/T, в процентах, где T – общая активность [¹²⁵I]-моноклональных антител к Т₄, измеряемая средней скоростью счета в пробирках T; V₀ – средняя скорость счета в пробирках, содержащих калибровочную пробу С₀.

7.3. Рассчитать соотношение V_i/V₀, в процентах, для каждой пары пробирок калибровочных, контрольной и неизвестных проб, где V_i – средняя скорость счета в пробирках, содержащих калибровочные, контрольную и неизвестные пробы.

7.4. Построить график зависимости отношения V_i/V₀, в процентах, от концентрации свободного Т₄ в калибровочных пробах в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения V_i/V₀, в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций свободного Т₄ в пмоль/л в соответствующих калибровочных пробах.

Для неизвестных и контрольной проб сывотки крови на основании соответствующих значений V_i/V₀, в процентах, по калибровочному графику определить содержание свободного Т₄.

8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1. Специфичность. Перекрестная реакция моноклональных антител со структурными аналогами тироксина приведена в таблице 2.

Таблица 2.

Исследуемые вещества	Перекрестная реакция, %
L-тироксин	100
D-тироксин	33
3,3',5-трийодо-L-тиронин	0,8
3,3',5-трийодо-D-тиронин	10,2

8.2 Чувствительность анализа. Минимальная достоверно определяемая концентрация свободного Т₄ составляет 0,4 пмоль/л.

8.3. Воспроизводимость результатов. Коэффициент вариации при измерении свободного Т₄ в образцах сывотки крови не превышает 8%.

8.4. Клиническая проверка. При клинических испытаниях набора диапазон концентраций свободного Т₄ в сывотке крови 198 здоровых лиц составил (11,5 – 23,0) пмоль/л.

8.5. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора РИА-Т₄-свободный уточнить значения концентраций свободного Т₄ соответствующие нормальным.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Набор РИА-Т₄-свободный должен храниться при температуре (2-8) °С. Компоненты набора, подготовленные к работе (см.п.5), могут храниться при температуре (2-8) °С в течение 3 суток.

9.2. При вскрытии и растворении лиофилизированных компонентов набора необходимо следить, чтобы на пробках не осталось сухого вещества.

9.3. Исследуемые образцы сывотки крови следует проверить на остаточную радиоактивность, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

9.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сывотку крови.

9.5. Исследуемые образцы можно хранить при температуре (2-8) °С в течение 24 ч или при температуре не менее минус 20 °С в течение длительного времени. Необходимо избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

9.6. Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки, аттестованные на точность по значению средней дозы и сходимость результатов пипетирования.

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