



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп.3
Факс (37517) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

РИА-Т₄-свободный

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ № ИМ-7.93262/1210 от 31.10.2012 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор РИА-Т₄-свободный предназначен для определения концентрации свободного Т₄ в сыворотке крови человека методом радиоиммунологического анализа. Набор предназначен для применения только in vitro.

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 гипотиреозе. Снижение уровня свободного Т₄ наблюдается при гипотиреозе.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [¹²⁵I]-моноклональные антитела к Т₄, общая активность (150-350) кБк, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 43 мл;

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

- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества свободного Т₄ в диапазоне концентраций (0; 1,5–85) пмоль/л (точные значения концентраций свободного Т₄ 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 43 неизвестных проб, 1 пробы общей активности [¹²⁵I]-моноклональных антител к Т₄, 5 калибровочных проб и 1 пробы КС, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 2 часа. Диапазон определяемых концентраций свободного Т₄ в образцах сыворотки крови человека – (0,4-85) пмоль/л.

2.4 Принцип метода состоит в следующем. Образцы инкубируются в пробирках с иммобилизованным авидином, 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) (Нормы радиационной безопасности ГН 2.6.1.8-127 и Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности СанПиН 2.6.1.8-8).

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 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, колодезного типа;

- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа (не менее 350 встряхиваний в мин.);

- водоструйный насос;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,025мл, 0,1мл и 0,4 и 0,5мл, аттестованные по значению средней дозы и схожести результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

- штатив для пробирок;

- перчатки резиновые хирургические;

- дистиллированная вода.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

5.2 Во флакон с КС внести 0,5 мл дистиллированной воды. Через 10 минут аккуратно перемешать содержимое, избегая образования пены. При вскрытии и растворении необходимо следить, чтобы на колпачках не осталось сухого вещества.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

- Т - для определения общей активности [¹²⁵I]-моноклональных антител к Т₄ в пробирке;

- В₀ – В₄ –калибровочные пробы свободного Т₄;

- В_{КС} – контрольная сыворотка;

- В_х –исследуемые сыворотки крови.

6.2 В пробирки В₀ – В₄ внести по 0,025 мл (25 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки В_{КС} внести по 0,025 мл (25 мкл) КС. В пробирки В_х внести по 0,025 мл (25 мкл) исследуемых образцов 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.

6.3 Во все пробирки, кроме Т, внести по 0,1 мл раствора лиганда.

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

6.5 Инкубировать все пробирки при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний в мин) в течение 1,5 ч. при температуре (18-25) °С.

6.6 Из всех пробирок, кроме Т, тщательно 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 дубликатах)	Последовательность операций			
	Калибровочные, КС, исследуемые пробы, мл	Лиганд мл	[¹²⁵ I]-моноклональные антитела к Т ₄ , мл	Инкубировать при постоянном встряхивании и температуре (18-25) °С в течение 1,5 ч. Из всех пробирок, кроме Т, тщательно удалить содержимое с помощью водоструйного насоса.
Т	-	-	0,4	
В ₀ -В ₄	0,025	0,1	0,4	
В _{КС}	0,025	0,1	0,4	
В _х	0,025	0,1	0,4	
Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [¹²⁵ I] 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 В₀/Т, в процентах, где Т – общая активность [¹²⁵I]-моноклональных антител к Т₄, измеряемая средней скоростью счета в пробирках Т; В₀ – средняя скорость счета в пробирках, содержащих калибровочную пробу С₀.

7.3 Рассчитать соотношение В_і/В₀, в процентах, для каждой пары пробирок калибровочных, контрольной и неизвестных проб, где В_і – средняя скорость счета в пробирках, содержащих калибровочные, контрольную и неизвестные пробы.

7.4 Построить график зависимости В_і/В₀, в процентах, от концентрации свободного Т₄ в калибровочных пробах в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения В_і/В₀, в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) – значения концентраций свободного Т₄ в пмоль/л в соответствующих калибровочных пробах.

Для неизвестных и контрольной проб сыворотки крови на основании соответствующих значений В_і/В₀, в процентах, по калибровочному графику определить содержание свободного Т₄.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

8.1.1 Перекрестная реакция моноклональных антител к Т₄ 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

8.2.1 Минимальная достоверно определяемая концентрация свободного Т₄ составляет 0,4 пмоль/л.

8.3 Воспроизводимость результатов

8.3.1 Коэффициент вариации при измерении свободного Т₄ в образцах сыворотки крови не превышает 8%.

8.4 Клиническая проверка

8.4.1 При клинических испытаниях набора диапазон концентраций свободного Т₄ в сыворотке 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.5.2), могут храниться при температуре (2-8) °С в течение 3 сут.

9.2 Определяемые образцы сыворотки крови следует проверить на остаточную радиоактивность, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

9.3 Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

9.4 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.

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

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

Приложение А (Информационное) Библиография

- [1] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД
- [2] Приказ № 66 от 20.04.93 г.
О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь
- [3] ОСТ 42-21-2-85
Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы