



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп.3
Факс (10 375 17) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРОКСИНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РИА-Т₄-СТ

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
29.10.2009 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор РИА-Т₄-СТ предназначен для количественного определения тироксина (Т₄) в сыворотке или плазме крови человека методом радиоиммунологического анализа. Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2 Количественное определение тироксина необходимо для диагностики и контроля за лечением нарушений функций щитовидной железы.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [¹²⁵I]-Т₄, активность (80-110) кБк, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 55 мл;

- пробирки полистирольные с иммобилизованными антителами к Т₄, готовы к использованию, 100 шт.;

- калибровочные пробы в диапазоне концентраций (0 – 400) нмоль/л (точные значения концентраций Т₄ указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 6 флаконов по 0,5 мл;

- контрольная сыворотка (КС) - лиофилизированный препарат, содержащий известное количество Т₄, 1 флакон.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных проб, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, а также 1 пробы общей активности [¹²⁵I]-Т₄ (всего 100 определений).

2.3 Набор позволяет определять концентрацию Т₄ в сыворотке или плазме крови человека в интервале от 0 до 400 нмоль/л.

2.4 Принцип работы набора состоит в следующем: в аналитической пробирке, содержащей компоненты набора и образец сыворотки крови, во время инкубации устанавливается равновесие между [¹²⁵I]-Т₄ и эндогенным гормоном анализируемого образца сыворотки крови с антителами, иммобилизованными на стенках пробирки. Количество связанного антителами [¹²⁵I]-Т₄ находится в обратной зависимости от концентрации Т₄ в крови. Разделение свободного и связанного антителами Т₄ осуществляют удалением инкубационной среды из пробирок с помощью водоструйного насоса. Концентрацию Т₄ в неизвестных образцах находят по калибровочному графику зависимости связанного [¹²⁵I]-Т₄ от концентрации Т₄ в калибровочных пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [¹²⁵I]-Т₄ является источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [¹²⁵I] – 60,1 сут.

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее - РВ) согласно требованиям ГН 2.6.1.8-127 и 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 спецодежду (халаты) и одноразовые резиновые перчатки, т.к. образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.4 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями приказов МЗ РБ № 66 и № 351. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями ОСТ 42-21-2-85.

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

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

4.1 Гамма-счетчик колодезного типа;

- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;

- водоструйный насос типа КМ-1230;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,02; 0,5 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

- штатив для пробирок;

- вода дистиллированная;

- перчатки резиновые хирургические.

5 ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

5.1 Компоненты набора перед использованием необходимо выдержать при комнатной температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Во флакон, содержащий контрольную сыворотку, внести 0,5 мл дистиллированной воды. Через 30 мин осторожно перемешать содержимое флакона, избегая образования пены.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными антителами к Т₄ маркировать следующим образом (в дубликатах): Т – для определения общей активности [¹²⁵I]-Т₄ в пробирке; В₀-В₅ – для построения калибровочной кривой; В_{КС} – для контрольной сыворотки; В_Х – для исследуемых проб сыворотки или плазмы крови;

6.2 В пробирки В₀-В₅ внести по 0,02 мл соответствующих калибровочных проб. В пробирки В_{КС} внести по 0,02 мл контрольной сыворотки. В пробирки В_Х внести по 0,02 мл исследуемых сывороток крови.

6.3 Во все пробирки внести по 0,5 мл [¹²⁵I]-Т₄.

6.4 Инкубировать все пробирки в течение 1 ч при комнатной температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании на приборе для встряхивания пробирок (не менее 350 встряхиваний в мин).

6.5 После окончания инкубации аккуратно удалить из всех пробирок, кроме Т, жидкость с помощью водоструйного насоса.

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

6.7 Последовательность проведения анализа приведена в таблице 1. Данную последовательность не нарушать!

Таблица 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			Пробирки инкубировать 1 ч при температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании.	Из всех пробирок, кроме Т, удалить содержимое с помощью водоструйного насоса.
	Калибровочные, контрольная сы-воротка или исследуемые пробы, мл	[¹²⁵ I]-Т ₄ , мл			
Т	-	-	0,5		
В ₀	0,02	-	0,5		
В ₁ - В ₅	0,02	-	0,5		
В _{КС}	-	0,02	0,5		
В _Х	-	0,02	0,5		
Измерить скорость счета [¹²⁵ I] в каждой пробирке в течение 1 мин.					

6.8 Учет результатов

6.8.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [¹²⁵I] для каждой пары пробирок.

В соответствии с маркировкой пробирок получить значения величин Т, В₀ – В₅, В_{КС}, В_Х.

6.8.2 Рассчитать отношение $V_0/T \times 100$, в процентах, где В₀ - средняя скорость счета в пробирках, содержащих пробу С₀;

Т – общая активность [¹²⁵I]-Т₄, измеряемая средней скоростью счета в пробах Т.

Значение $V_0/T \times 100$ должно быть не менее 60%.

6.8.3 Рассчитать величину $V_i/V_0 \times 100$, в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной сыворотки и неизвестных проб, где В_і – среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I] в пробирках В₁-В₅, В_{КС} и В_Х.

6.8.4 Построить калибровочный график зависимости $V_i/V_0 \times 100$, в процентах от концентрации Т₄ в калибровочных пробах (нмоль/л) в координатах "logit-log".

6.8.5 По калибровочному графику определить содержание Т₄ в исследуемых образцах сыворотки крови.

Для перевода молярной концентрации в массовую следует пользоваться соотношением:

$$\text{нмоль/л} \times 0,777 = \text{нг/мл}$$

7 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

7.1 Специфичность

7.1.1 Перекрестная реакция антисыворотки со структурными аналогами Т₄ приведена в таблице 2.

Таблица 2

Исследуемые вещества	Перекрестная реакция, %
L-тироксин (L-Т ₄)	100
D-тироксин (D-Т ₄)	33
3,3,5-трийодо-L-тиронин (L-Т ₃)	0,8
3,3,5-трийодо-D-тиронин (D-Т ₃)	10,2
3,3,5-трийодтироуксусная кислота	6,6
3,5-трийодтиропропионовая кислота	2,8

7.2 Чувствительность

7.2.1 Минимальная достоверно определяемая концентрация Т₄, определяемая с помощью набора, составляет 14 нмоль/л.

7.3 Воспроизводимость результатов

7.3.1 Коэффициент вариации при измерении Т₄ в образцах сыворотки крови с помощью набора РИА-Т₄-СТ не превышает 8%.

7.4 Тест на "открытие"

7.4.1 В пробы (n=10) с измеренной концентрацией Т₄ добавлялись известные количества гормона и измерялась концентрация Т₄ в полученных пробах. Процент "открытия" составил (90-110)%.

7.5 Линейность

7.5.1 Зависимость концентрации Т₄ от разведения исходных образцов сыворотки крови доноров с различным содержанием эндогенного гормона калибровочной пробой С₀ имеет линейный характер и составляет (90-110) % от расчетной величины.

7.6 Клиническая апробация набора

7.6.1 Концентрация Т₄ в сыворотке крови здоровых лиц в возрасте от 20 до 45 лет, определенная с помощью набора РИА-Т₄-СТ, составила (60-160) нмоль/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций Т₄, соответствующие нормальным.

8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1 Компоненты набора должны храниться при температуре (2 – 8) °С в течение всего срока годности набора.

8.2 Контрольная сыворотка, подготовленная к использованию (п.5.2.), может храниться при температуре (2 – 8) °С не более 3 суток.

8.3 Определение концентрации Т₄ с помощью набора РИА-Т₄-СТ проводят в сыворотке или плазме 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 минус 20 °С в течение более длительного времени (допускается только однократное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

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

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

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