ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИЙОДТИРОНИНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РИА-T_3-СТ

Согласована Министерством здравоохранения Республики Беларусь _____

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор РИА-T_3-СТ предназначен для количественного определения трийодтиронина (T_3) в сыворотке или плазме крови человека методом радиоиммунологического анализа. Набор предназначен для применения только in vitro.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [^{125}I]-T_3, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 55 мл, общая активность (80-110) кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к T_3, готовы к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы, содержащие известные количества T_3 в диапазоне концентраций (0; 0,75 – 12) нмоль/л (точные значения концентраций T_3 указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 6 флаконов по 0,5 мл;
- контрольная сыворотка (КС) - жидкий препарат, содержащий известное количество T_3, готов к использованию, 0,5 мл, 1 флакон.

Б.2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 43 неизвестных проб, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, (всего 100 определений).

2.3 Продолжительность анализа 1,5 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций T_3 в образцах сыворотки или плазме крови человека (0,3 – 12) нмоль/л.

2.5 Принцип работы набора состоит в следующем: в аналитической пробирке, содержащей компоненты набора и образец сыворотки крови, во время инкубации устанавливается равновесие между [^{125}I]-T_3 и эндогенным гормоном анализируемого образца сыворотки крови с антителами, иммобилизованными на стенках пробирки. Количество связанного антителами [^{125}I]-T_3 находится в обратной зависимости от концентрации T_3 в крови.

Разделение свободного и связанного антителами T_3 осуществляют удалением инкубационной среды из пробирок с помощью водоструйного насоса. Концентрацию T_3 в неизвестных образцах находят по калибровочному

ДИРЕКТОР Симирский В. В.
КОПИЯ ВЕРНА
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

графику зависимости связанного [^{125}I]-T_3 от концентрации T_3 в калибровочных пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [^{125}I]-T_3 является источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [^{125}I] – 60,1 сут.

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее - РВ) согласно требованиям Санитарных норм и правил «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при осуществлении деятельности по использованию атомной энергии и источников ионизирующего излучения», утверждённых Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 137 от 31.12.2013 г.

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 [2], [3]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [4].

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;
- водоструйный насос;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,05 и 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 РЕАГЕНТОВ

УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ ... ОПЫТНОЕ ПРОИЗВОДСТВО ИНСТИТУТА БИОФИЗИКИ ... БЕЛАРУСИ"

ДИРЕКТОР
СИМИРСКИЙ В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Пробирки с иммобилизованными моноклональными антителами к T_3 маркировать следующим образом (в дубликатах): B_0-B_5 – для калибровочных проб T_3; $B_{КС}$ – для контрольной сыворотки; B_X – для исследуемых проб сыворотки или плазмы крови человека;

6.2 В пробирки B_0-B_5 внести по 0,05 мл (50 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $B_{КС}$ внести по 0,05 мл (50 мкл) контрольной сыворотки. В пробирки B_X внести по 0,05 мл (50 мкл) исследуемых сывороток крови человека.

6.3 Во все пробирки внести по 0,5 мл (500 мкл) [^{125}I]-T_3.

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

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

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

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

Таблица 1

<table>
<tr><td rowspan="2">Пробирки (в дубликатах)</td><td colspan="4">Последовательность операций</td></tr>
<tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td></tr>
<tr><td></td><td>Калибровочные пробы, контрольная сыворотка и исследуемые пробы, мл</td><td>[^{125}I]-T_3, мл</td><td rowspan="5">Пробирки инкубировать в течение 1 ч при температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании.</td><td rowspan="5">Из всех пробирок удалить содержимое с помощью водоструйного насоса.</td></tr>
<tr><td>B_0</td><td>0,05</td><td>0,5</td></tr>
<tr><td>B_1 - B_5</td><td>0,05</td><td>0,5</td></tr>
<tr><td>$B_{КС}$</td><td>0,05</td><td>0,5</td></tr>
<tr><td>B_X</td><td>0,05</td><td>0,5</td></tr>
<tr><td colspan="5">Измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин.</td></tr>
</table>

7 РАСЧЁТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [^{125}I] для каждой пары пробирок.

7.2 Рассчитать величину $B_i/B_0 \times 100$, в %, для каждой калибровочной пробы, контрольной сыворотки и неизвестных проб, где B_i – среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках B_1-B_5, $B_{КС}$ и B_X.

7.3 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) отношение $B_i/B_0 \times 100$, в %, а на оси абсцисс (логарифмическая) - значения концентраций T_3 в соответствующих калибровочных пробах

ПРЕДПРИЯТИЕ ХОЗРАСЧЕТНОЕ ОПЫТНОЕ ПРОИЗВОДСТВО ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

ДИРЕКТОР
СИМИРСКИЙ В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.4 По калибровочному графику определить содержание T_3 в исследуемых образцах сыворотки крови.

Для перевода молярной концентрации в массовую следует пользоваться соотношением:

нмоль/л × 65 = нг/100 мл

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

8.1.1 Перекрестная реакция антисыворотки со структурными аналогами T_3 приведена в таблице 2.

Таблица 2

Исследуемые вещества	Перекрестная реакция, %
3,3′,5′ – трийодо-L-тиронин	100
L-тироксин (L-T4)	0,1

8.2 Чувствительность

8.2.1 Минимальная достоверно определяемая с помощью набора концентрация T_3, составляет 0,3 нмоль/л.

8.3 Воспроизводимость результатов.

8.3.1 Коэффициент вариации при измерении T_3 в образцах сыворотки крови с помощью набора РИА-T_3-СТ не превышает 8%.

8.4 Тест на «открытие»

8.4.1 В пробы (n=10) с измеренной концентрацией T_3 добавлялись известные количества гормона и измерялась концентрация T_3 в полученных пробах. Процент «открытия» составил 90-110.

8.5 Тест на «линейность»

8.5.1 Зависимость концентрации T_3 от разведения исходных образцов сыворотки крови доноров с различным содержанием эндогенного гормона калибровочной пробой C_0 имеет линейный характер и составляет 90-110 % от расчетной величины.

8.6 Клиническая апробация набора.

8.6.1 Концентрация T_3 в сыворотке крови здоровых лиц в возрасте от 20 до 45 лет, определенная с помощью набора РИА-T_3-СТ, составила (1,2-2,8) нмоль/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций T_3, соответствующие нормальным.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

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

9.2 Определение концентрации T_3 с помощью набора РИА-T_3-СТ проводят в сыворотке или плазме крови человека.

УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "ХОЗРАСЧЁТНОЕ ОПЫТНОЕ ПРОИЗВОДСТВО ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ"
ДИРЕКТОР СИМИРСКИЙ В. В.
КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3 Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку, сыворотку с повышенным содержанием липидов.

Образцы сыворотки или плазмы крови хранят при температуре (2-8)°С, если анализ проводят в течение 24 ч после взятия крови. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре не менее минус 15-20 °С в течение более длительного времени (допускается только однократное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при температуре (18-25)^{0}С.

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

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

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

Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
SN	**Серийный номер** Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	**Использовать до** Настоящий символ сопровождается датой, указывающей, что изделие рекомендуется использовать до истечения установленного срока; дата состоит из четырех цифр, указывающих год, двух цифр, указывающих месяц, и двух цифр, указывающих день
IVD	**Изделие для диагностики in vitro**
	**Ограничение температуры** Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	**Изготовитель** Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя
	**Содержимого достаточно для проведения n-тестирований** Настоящий символ сопровождается указанием количества определений
	**Знак радиационной опасности** Настоящий символ сопровождается указанием общей активности изотопа [^{125}I] в наборе, кБк

ДИРЕКТОР СИМИРСКИЙ В.В. КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

Тел./факс +375-17-369-82-57 E-mail:hopmang.bel@gmail.com
http://www.hopiboh.org

По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в БТК, тел. +375-17-268-87-38

Библиография

[1] Серия норм МАГАТЭ по безопасности, № ST-1.
Правила безопасной перевозки радиоактивных материалов, 1996

[2] Приказ №351 от 16.12.98г.
Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД

[3] СП 17-69 РБ 98
«Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний» утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1998 г. №18

[4] Приказ №165 МЗ РБ от 25.11.2002 г.
О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения

[5] Перечень методик выполнения измерений, допущенных к применению в деятельности лабораторий санитарно-эпидемиологических учреждений и других предприятий и организаций Республики Беларусь. Утвержден Главным Государственным санитарным врачом Республики Беларусь и согласован Госстандартом Республики Беларусь 10.09.2002 г.

[6] Постановление МЗ РБ № 31 от 26.04.2011 г
Об утверждении инструкции о порядке проведения обязательных медицинских осмотров работающих и признании утратившими силу некоторых Постановлений Министерства здравоохранения Республики Беларусь.
СанПиН 2.6.1.13-60-2005

[7] Гигиенические требования по обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при транспортировании радиоактивных материалов (веществ).

Инструкция составлена сотрудниками УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»:

Начальник научно-технического отдела, к.б.н. А.И.Щербань

Младший научный сотрудник Н.В.Михайловская

УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ ОПЫТНОЕ ПРОИЗВОДСТВО ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

ДИРЕКТОР СИМИРСКИЙ В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru