ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРОКСИНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РИА-T_4-СТ

Согласована Министерством здравоохранения Республики Беларусь_____

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор РИА-T_4-СТ предназначен для количественного определения тироксина (T_4) 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:

- [^{125}I]-T_4, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 55 мл, общая активность (80-110) кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к T_4, готовы к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы, содержащие известные количества T_4 в диапазоне концентраций (0; 25 – 400) нмоль/л (точные значения концентраций T_4 указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 6 флаконов по 0,5 мл;
- контрольная сыворотка (КС) - жидкий препарат, содержащий известное количество T_4, готов к использованию, 0,5 мл, 1 флакон.

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_4 в образцах сыворотки или плазме крови человека (14 – 400) 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_4 и эндогенным гормоном анализируемого образца сыворотки крови с антителами, иммобилизованными на стенках пробирки. Количество связанного антителами [^{125}I]-T_4 находится в обратной зависимости от концентрации T_4 в крови. Разделение свободного и связанного антителами T_4 осуществляют удалением инкубационной среды из пробирок с помощью водоструйного насоса.

Директор Симирский В.В.

КОПИЯ ВЕРНА

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

Концентрацию T_4 в неизвестных образцах находят по калибровочному графику зависимости связанного [^{125}I]-T_4 от концентрации T_4 в калибровочных пробах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [^{125}I]-T_4 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 0,02; 0,5 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штатив для пробирок;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

Директор Симирский В.В.
КОПИЯ ВЕРНА

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

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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_4 маркировать следующим образом (в дубликатах): B_0-B_5 – для калибровочных проб T_4; $B_{КС}$ – для контрольной сыворотки; B_X – для исследуемых проб сыворотки или плазмы крови человека.

6.2 В пробирки B_0-B_5 внести по 0,02 мл (20 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $B_{КС}$ внести по 0,02 мл (20 мкл) контрольной сыворотки. В пробирки B_X внести по 0,02 мл (20 мкл) исследуемых образцов сыворотки или плазмы крови человека.

6.3. Во все пробирки внести по 0,5 мл (500 мкл) [^{125}I]-T_4.

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 тщательно 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 внесения реагентов в пробирки и проведение других операций 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_4, мл</td><td rowspan="4">Пробирки инкубировать в течение 1 ч при температуре (18-25) °С и постоянном встряхивании.</td><td rowspan="4">Из всех пробирок удалить содержимое с помощью водоструйного насоса.</td></tr>
<tr><td>B_0</td><td>0,02</td><td>0,5</td></tr>
<tr><td>B_1 - B_5</td><td>0,02</td><td>0,5</td></tr>
<tr><td>$B_{КС}$</td><td>0,02</td><td>0,5</td></tr>
<tr><td>B_X</td><td>0,02</td><td>0,5</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td colspan="5">Примечание: Измерить скорость счета [^{125}I] в каждой пробирке в течение 1 мин.</td></tr>
</table>

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

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

УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "ХОЗРАСЧЁТНОЕ ОПЫТНОЕ ПРОИЗВОДСТВО ИНСТИТУТА БИОФИЗИКИ ХИМИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ"

ДИРЕКТОР
СИМИРСКИЙ В. В.

КОПИЯ ВЕРНА

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

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 по оси ординат (линейная) отношение $B_i/B_0 \times 100$, в %, а на оси абсцисс (логарифмическая) - значения концентраций T_4 (нмоль/л) в соответствующих калибровочных пробах.

7.4 По калибровочному графику определить содержание T_4 в исследуемых образцах сыворотки крови.

Для перевода молярной концентрации в массовую следует пользоваться соотношением:

нмоль/л × 7,77 = нг/100 мл

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

8.1.1 Перекрестная реакция антисыворотки со структурными аналогами T_4 приведена в таблице 2.

Таблица 2

Исследуемые вещества	Перекрестная реакция, %
L-тироксин (L-T_4)	100
D-тироксин (D-T_4)	33
3,3,5–трийодо-L-тиронин (L-T3)	0,8
3,3,5-трийодо-D-тиронин (D-T3)	10,2
3,3,5-трийодтироуксусная кислота	6,6
3,5-трийодтиропропионовая кислота	2,8

8.2 Чувствительность

8.2.1 Минимальная достоверно определяемая концентрация T_4, определяемая с помощью набора, составляет 14 нмоль/л.

8.3 Воспроизводимость результатов

8.3.1 Коэффициент вариации при измерении T_4 в образцах сыворотки крови с помощью набора РИА-T_4-СТ не превышает 8%.

8.4 Тест на "открытие"

8.4.1 В пробы (n=10) с измеренной концентрацией T_4 добавлялись известные количества гормона и измерялась концентрация T_4 в полученных пробах. Процент "открытия" составил 90-110.

8.5 Тест на "линейность".

8.5.1 Зависимость концентрации T_4 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_4 в сыворотке крови здоровых лиц в возрасте от 20 до 45 лет, определенная с помощью набора РИА-T_4-СТ, составила (60-160) нмоль/л.

УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "ХОЗРАСЧЁТНОЕ ОПЫТНОЕ ПРОИЗВОДСТВО ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДИРЕКТОР СИМИРСКИЙ В.В.
КОПИЯ ВЕРНА

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

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения концентраций T_4, 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_4 с помощью набора РИА-T_4-СТ проводят в сыворотке или плазме крови человека.

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.

9.4 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**

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

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

	**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

 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

[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



ДИРЕКТОР
СИМИРСКИЙ В. В.

КОПИЯ ВЕРНА

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

силу некоторых Постановлений Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

[7] СанПиН 2.6.1.13-60-2005
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 "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