# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РИА-$T_4$-свободный

## 1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор РИА-$T_4$-свободный предназначен для определения концентрации свободного тироксина ($T_4$-свободного) в сыворотке крови человека методом радиоиммунологического анализа. Набор предназначен для применения только in vitro.

1.2 Тироксин ($T_4$) – гормон с молекулярной массой около 777 Да, который синтезируется щитовидной железой и циркулирует в крови, главным образом, в связанном с белками крови состоянии.

В сыворотке крови тироксин связан тремя белками: тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ), который связывает 70 % $T_4$, тироксинсвязывающим преальбумином (ТСПА), связывающим 20 % $T_4$ и альбумином.

Приблизительно 0,03 % тироксина циркулирует в крови в не связанном с белками состоянии ($T_4$-свободный). Свободный гормон отвечает за биологическую активность. Концентрация $T_4$-свободного 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 (употребление андрогенов или салицилатов, нефротический синдром), а также при снижении связывающей способности белков.

Таким образом, уровень $T_4$-свободного наиболее достоверно отражает статус щитовидной железы. Его повышенная концентрация имеет место при центральном или периферическом гипертиреозе. Снижение уровня $T_4$-свободного наблюдается при гипотиреозе.

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- $[^{125}I]$-моноклональные антитела к $T_4$, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 43 мл, общая активность (150-350) кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованным авидином, готовы к использованию, 100 шт.;
- пять калибровочных проб в диапазоне концентраций $T_4$-свободного (0; 1,5-85) пмоль/л (точные значения концентраций $T_4$-свободного указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 5 флаконов по 0,50 мл;
- контрольная сыворотка (КС) – жидкий препарат из объема 0,5 мл, (0,50±0,05), содержащий известное количество $T_4$-свободного (диапазон концентраций $T_4$-свободного указывается на этикетке), готов к использованию, 1 флакон;
- лиганд – жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 12,0 мл.



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

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

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 44 неизвестных проб, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 2 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций $T_4$-свободного (0,4-85) пмоль/л.

2.5 Принцип работы набора основан на методе одностадийного твердофазного конкурентного радиоиммунологического анализа (РИА).

Образцы инкубируются в пробирках с иммобилизованным авидином, совместно с [$^{125}$I]-моноклональными антителами к $T_4$ и биотинилированным тироксином (лигандом). Свободный тироксин образца вытесняет определенную часть лиганда из его комплекса с антителами. Комплекс лиганд--антитело связывается с авидином, иммобилизованным на стенках пробирок. После инкубации содержимое пробирок удаляют, и измеряют связанную активность [$^{125}$I].

Концентрацию $T_4$-свободного в неизвестных образцах, обратно пропорциональную измеренной скорости счета, находят по калибровочному графику зависимости связанной активности [$^{125}$I] носителя от концентрации $T_4$-свободного в калибровочных пробах.

## 3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [$^{125}$I]-моноклональные антитела к $T_4$ является источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [$^{125}$I] – 60,1 сут.

При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (далее – РВ) согласно требованиям Санитарных норм и правил «Требования к радиационной безопасности», Гигиенического норматива «Критерии оценки радиационного воздействия», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.12.2012 г. № 213, с дополнением, утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.12.2013 г. № 137.

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.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать гемоконтактные инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [2], [3], [4], [5]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [6].



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

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

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

3.5 Все радиоактивные отходы, образованные в процессе использования набора собираются, хранятся и удаляются в соответствии с требованиями [8].

## 4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты или осадок, при помощи центрифугирования. Собранные образцы сывороток хранят при температуре (2-8) °С в течение 72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже минус 20 °С) не более двух раз. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать чистым наконечником.

4.2 Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, повышенным содержанием билирубина, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания, не пригодны для анализа.

4.3 Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- температура в помещении, где проводится анализ, должна быть (18-25) °С;
- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- не допускается использование реагентов с нарушением герметичности упаковки;
- использовать только новые наконечники для внесения каждого образца и реагента;
- необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования.

## 5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- гамма-счетчик колодезного типа, позволяющий измерять активность изотопа [$^{125}$I];
- прибор для встряхивания пробирок вибрационного типа;
- вихревой смеситель;
- водоструйный насос;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,02 до 5,00 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штатив для пробирок;
- перчатки хирургические резиновые;
- дезинфицирующие средства.



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

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

## 6 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

6.1 Образцы сывороток крови, в том числе полученных с помощью активатора свертывания крови (в комплексе с разделяющим гелем или без него), могут храниться до анализа не более трех суток при температуре (2-8) °С. Допускается хранение образцов в замороженном состоянии при температуре ниже минус 20 °С в течение трех месяцев, при температуре минус 70 °С в течение двух лет. Не использовать сыворотки, которые замораживались/размораживались более двух раз.

6.2 Размораживание образцов сывороток проводить при температуре (18-25) °С. Образцы тщательно перемешать пипетированием в течение не менее 1 мин для достижения однородности.

6.3 Образцы, содержащие агрегаты и осадок, перед анализом осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 1900 g (2500-3000 об/мин).

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

## 7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1 Перед использованием выдержать компоненты набора и анализируемые образцы сывороток крови при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

7.2 Хранение реагентов после вскрытия упаковки

Флаконы с реагентами закрывать крышками сразу после использования, предупреждая их контаминацию.

В ходе анализа допускается хранение реагентов в течение 8 ч при температуре (18-25) °С в защищенном от света месте.

Все неиспользованные компоненты набора хранить в плотно закрытой первичной упаковке при температуре (2-8) °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

7.3 Во флакон, содержащий лиофилизованную контрольную сыворотку, внести 0,5 мл дистиллированной воды. Через 10 мин осторожно перемешать содержимое флакона, избегая образования пены. При вскрытии и растворении необходимо следить, чтобы на колпачке не осталось сухого вещества.

Раствор контрольной сыворотки может храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

## 8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Пробирки полистирольные с иммобилизованным авидином маркировать следующим образом (в дубликатах):

$B_0$-$B_4$ – для калибровочных проб $T_4$-свободного;

$B_{КС}$ – для КС;

$B_X$ – для исследуемых проб сыворотки крови человека.

Б.8.2 В пробирки $B_0$-$B_4$ внести по 0,025 мл (25 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки $B_{КС}$ внести по 0,025 мл (25 мкл) контрольной сыворотки. В пробирки $B_X$ внести по 0,025 (25 мкл) исследуемых сывороток крови человека.



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

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

8.3 Во все пробирки внести по 0,1 мл (100 мкл) лиганда.

8.4 Во все пробирки внести по 0,4 мл (400 мкл) [$^{125}$I]-моноклональных антител к $T_4$.

8.5 Содержимое пробирок инкубировать в течение 1,5 ч при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок при температуре (18-25) °С.

8.6 После окончания инкубации тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса.

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

8.8 Последовательность операций анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1

| Пробирки (в дубликатах) | Последовательность операций | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Калибровочные пробы, КС и исследуемые сыворотки крови человека, мл | Лиганд мл | [$^{125}$I]-моноклональные антитела к $T_4$, мл | Инкубировать 1,5 ч при постоянном встряхивании при температуре (18-25)°С | Тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса |
| $B_0$-$B_4$ | 0,025 | 0,1 | 0,4 | | |
| $B_{КС}$ | 0,025 | 0,1 | 0,4 | | |
| $B_X$ | 0,025 | 0,1 | 0,4 | | |
| Измерить скорость счета [$^{125}$I] в каждой пробирке в течение 1 мин | | | | | |

## 9 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

9.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [$^{125}$I] для каждой пары пробирок, в имп/мин.

9.2 Рассчитать величину $(Bi/B_0)\times100$, в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной или исследуемой сыворотки крови человека, где Bi -- среднее арифметическое значение скорости счета [$^{125}$I] в пробирках $B_1$-$B_4$, $B_{КС}$ и $B_X$.

9.3 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения $(Bi/B_0)\times100$, в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) -- значения концентраций $T_4$-свободного, в пмоль/л, в соответствующих калибровочных пробах.

9.4 Определить по калибровочному графику содержание анти-ТПО, в МЕ/мл, в КС и исследуемых образцах сыворотки крови человека.

## 10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

10.1 Чувствительность

Минимальная концентрация $T_4$-свободного, определяемая с помощью набора, составляет не более 0.4 пмоль/л.

10.2 Специфичность

Моноклональные антитела, используемые в наборе, обладают высокой специфичностью к $T_4$.

Перекрестная реакция со структурными аналогами тироксина очень мала.



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

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

При выполнении анализа возможна интерференция гетерофильными антителами в пробе пациента. У пациентов, имеющих постоянный контакт с животными или проходивших иммунотерапию или диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или их фрагментов, могут вырабатываться антитела (т.е.НАМА), которые влияют на результат иммунного анализа. Влияние этих антител может привести к получению ошибочных результатов. Тщательно проверяйте результаты анализов пациентов с подозрением на наличие этих антител.

10.3 Воспроизводимость результатов

Коэффициент вариации результатов определений (n=10) концентрации $T_4$-свободного в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием кортизола не превышает 8 %.

10.4 Клиническая проверка набора

При клинических испытаниях набора диапазон концентраций $T_4$-свободного в сыворотке крови 198 здоровых лиц составил (11,5-23,0) пмоль/л.

Приведенные значения являются ориентировочными. Рекомендуется в каждой лаборатории установить собственные уровни $T_4$-свободного, соответствующие нормальным.

Результаты определения должны быть интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данных других тестов и иной подходящей информации.

## 11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1 Набор должен храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

11.2 Срок годности набора – 60 суток.

11.3 Определение концентрации $T_4$-свобордного с помощью набора РИА-$T_4$-свободный проводят в сыворотке 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 не менее минус 20 °С в течение более длительного времени – не более 3 месяцев (допускается только двукратное замораживание и размораживание образцов). Размораживание образцов проводят при комнатной температуре.

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

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

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



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

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