

Набор Т3 [-125] RIA

(Номер по каталогу: RK-609CT)

Система [^{125}I] T_3 RIA позволяет проводить *in vitro* количественное определение уровня L-3,5,3'-трийодтиронина (T_3) в сыворотке человека в диапазоне 0-12 нмоль/л (0-780 нг/дл).

Введение

Среди тиреоидных гормонов, вырабатываемых в щитовидной железе, трийодтиронин (T_3) считается наиболее биологически активным веществом, до 80% которого образуется в результате дейодирования тетраидтиронина (T_4) в периферических тканях.

T_3 находится в крови в основном (99,7%) в связанном с белком состоянии, и незначительное количество (0,3%) – в виде несвязанной фракции. Изменение общего уровня гормонов щитовидной железы в крови может наблюдаться в результате либо изменения степени связывания с белками или образования гормонов в щитовидной железе.

T_3 вносит значительный вклад в поддержание эутиреоидного состояния, определение общего уровня T_3 играет роль в скрининге заболеваний щитовидной железы в сочетании с другими тестами. По одному исследованию уровня T_3 нельзя установить диагноз гипотиреоза, но оно может быть более чувствительным, чем определение уровня T_4 для диагностики гипертиреоза.

Принцип метода

Методика количественного определения основана на конкуренции между немеченым T_3 и определенным количеством ^{125}I -меченого T_3 за ограниченное количество участков связывания на T_3 -специфических антителах. Фиксированное количество метки и антител реагирует с различным количеством немеченых лигандов, количество меток, связанных с антителами, будет обратно пропорционально концентрации немеченых лигандов.

Во время 1-часового инкубационного периода при постоянном помешивании иммунокомплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок. После периода инкубации реакционную смесь извлекают и измеряют радиоактивность в гамма-счетчике.

Концентрация антигена обратно пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем нанесения значений связывания, соответствующих стандартам, содержащим известное количество T_3 , строится калибровочная кривая, с помощью которой можно определить концентрацию T_3 в образцах пациента.

Содержание набора

1) 1 флакон ^{125}I -МЕТКИ (22 мл), содержащей ^{125}I -меченый T_3 в буфере с красным красителем и 0.1 % NaN_3 , Kathon CG, содержащий около <260 кБк.

2) 6 флаконов СТАНДАРТА (6 x 1.0 мл), содержащих (S0-S5) 0; 0,75; 1,5; 3; 6; 12 нмоль/л T_3 в сыворотке с 0.1% NaN_3 и Kathon CG. Точная концентрация стандартов указана в прилагаемом сертификате качества.

3) 2 флакона КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ (2 x 1.0 мл), содержащей сыворотку с 0.1% NaN_3 и Kathon CG. Концентрация контрольной сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества.

4) 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, 2x50 шт, 12 x 75 мм, упакованные в пластиковые коробки.

Сертификат качества

Листок-вкладыш и инструкция по применению.

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными наконечниками (50 мкл, 200 мкл и 1000 мкл), шейкер, полимерная пленка, адсорбирующая ткань, гамма-счетчик, дистиллированная вода.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

автоматические пипетки (напр., Eppendorf и др.).

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °С, если исследование проводится в течение 24 часов, иначе аликвоты следует готовить и хранить в условиях глубокой заморозки (-20 °С). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать.

Приготовление и хранение реактивов

Открытые реактивы следует хранить при температуре 2-8 °С. При такой

температуре каждый реактив стабилен до окончания срока годности набора. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества. Обе упаковки с пробирками следует открывать в одно и то же время.

ВНИМАНИЕ!

Уравновесьте все реагенты и образцы сыворотки до комнатной температуры. Тщательно смешайте все реактивы и образцы перед использованием. Избегайте чрезмерного пенообразования.

Процедура количественного определения

(Краткое описание см. в Таблице 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реактивы и образцы до комнатной температуры.
2. Промаркируйте в двух экземплярах пробирки с покрытием для каждого стандарта (S0-S5), контрольной сыворотки (C1, C2) и образцов (U). При желании, пометьте 2 пробирки для подсчета общей радиоактивности (T).
3. Гомогенизируйте все реактивы и образцы аккуратным перемешиванием, избегая вспенивания.
4. С помощью пипетки поместите по 50 мкл стандартов, контрольной сыворотки и образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки.
5. С помощью пипетки поместите в каждую из пробирок 200 мкл метки.
6. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Закройте все пробирки полимерной пленкой. Включите шейкер и настройте скорость таким образом, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась.
7. Инкубируйте пробирки на шейкере в течение 1 часа при комнатной температуре.
8. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив в перевернутом состоянии на 2 минуты на фильтровальную бумагу.
9. Добавьте в каждую пробирку 1 мл дистиллированной воды и повторите шаг 8.
10. Определите радиоактивность каждой пробирки, поместив ее в гамма-счетчик как минимум на 60 секунд.
11. Рассчитайте концентрацию T_3 в образцах, как это описано в разделе «расчет результатов».

Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2.

Рассчитайте среднее значение в минуту (CPM) для каждой пары исследуемых пробирок.

Рассчитайте процентное связывание $V_0/T\%$ для нулевого стандарта (S_1), используя следующую формулу:

$$V_0/T(\%) = \frac{S_0(\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контрольной сыворотки и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$V/B_0(\%) = \frac{S_{1-5} / CI, CII / U_x(\text{cpm})}{S_0(\text{cpm})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу, постройте график $V/B_0(\%)$ для каждого стандарта в соответствии с соответствующей концентрацией T_3 . На рисунке 1 представлена типичная калибровочная кривая. Определите концентрацию T_3 в неизвестных образцах методом интерполяции данных калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, находящиеся за пределами диапазона калибровочной кривой.

Из доступных прикладных программ автоматической обработки данных в данном случае можно использовать логит-преобразование или аппроксимацию данных с помощью сплайн-функций.

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения с помощью пипетки (все объемы представлены в микролитрах)

	T	S0-S5	CI/CII	Ux
Стандарт		50		
Контрольный образец			50	
Образец				50
Метка	200	200	200	200
*Перемешивать в течение 1 часа при комнатной температуре				
Удалите жидкость и поместите перевернутые пробирки на фильтровальную бумагу				
Дистиллированная вода		1000	1000	1000
Удалите жидкость и поместите перевернутые пробирки на фильтровальную бумагу				
Измерьте уровень радиоактивности (60 сек/пробирка)				
Рассчитайте результаты				

* Инкубирование в течение 30 минут при комнатной температуре, достаточно, если испытание проводится на автоматизированном RIA машине.

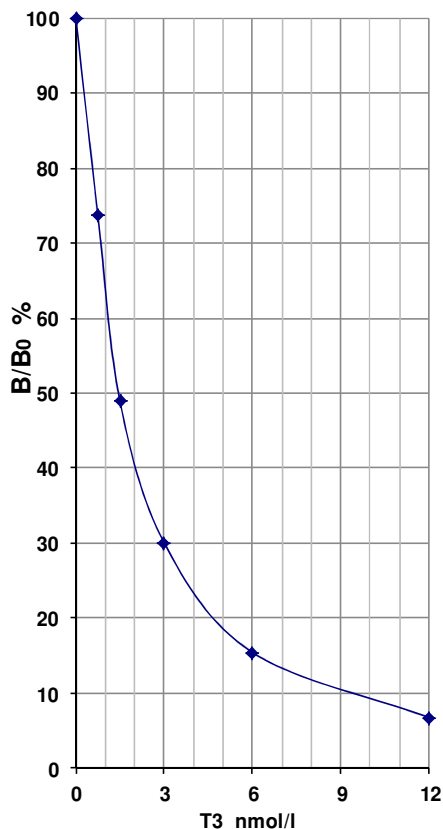


Рисунок 1.

Типичная калибровочная кривая (не используйте для расчетов результатов количественного определения образцов!)

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Число cpm	Среднее cpm	Vo/T (%)	V/Bo (%)
T	117 173 116 098	116 636		
S0	91 002 90 977	90 990	78.5	100.0
S1	66 959 67 119	67 039		73.7
S2	44 397 44 591	44 494		48.9
S3	27 296 27 410	27 353		30.1
S4	14 000 14 050	14 025		15.4
S5	5 922 6 326	6 124		6.7
CI	40 186 40 184	40 185	44.2	
CII	21 628 21 000	21 314		23.4

Характеристика количественного определения

Преобразование в единицы СИ может быть выполнено с помощью следующих формул:

$$1 \text{ нмоль/л} = 65 \text{ нг/дл}$$

$$1 \text{ нг/дл} = 0.0154 \text{ нмоль/л}$$

Референтный интервал

Референтный диапазон нормальных значений для здоровых лиц

составляет 1.25 – 3.03 нмоль/л. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория самостоятельно устанавливала референтные интервалы. Представленные ожидаемые значения установлены по результатам исследования здоровых доноров крови. Образцы были протестированы дважды.

Чувствительность

Предел холостого образца (LoB), предел обнаружения (LoD) и предел количественного определения (LoQ) были определены в соответствии с руководствами CSLI документ EP17. Предел холостого образца: 0,22 нмоль/л

Предел обнаружения: 0,32 нмоль/л, определенный как соотношение ложно положительных результатов (α) менее 5% и ложно отрицательных результатов (β) менее 5% на основании 205 исследований с 4 холостыми образцами и 4 образцами с низким уровнем концентрации.

Предел количественного определения: 0,37 нмоль/л, определяется графически по калибровочной кривой.

Точность

Внутрисубъектная вариабельность

Образец	Среднее значение нмоль/л	Внутрисубъектная вариабельность CV%
CI	1.90	3.30
CII	4.49	2.98
FT4Pool4,1	1.20	3.07
FT4Pool37,4	3.40	3.44

Межсубъектная вариабельность

Образец	Среднее значение нмоль/л	Межсубъектная вариабельность CV%
RK-6CT_1	0.22	23.9
T3Pool-A	0.67	8.6
T3Pool-B	1.16	6.3
T3Pool-C	2.13	4.5
T3Pool-E	3.91	4.1
FT4Pool63.9	7.20	4.1

Восстановление

Восстановление было определено как измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста насыщения образцов сыворотки известным количеством T_3 . Среднее значение восстановления ($\pm CO$) для добавленного IRMM-469 T_3 (6 образцов, 3, 5, 8 нМ добавленного T_3) составило $76.8 \pm 7.2\%$.

Линейность

Линейность метода оценивалась с помощью 4 образцов различных

концентраций при 2-х, 4-х и 8-кратном разведении. Разведение с помощью нулевого стандарта, входящего в состав набора, позволило получить среднее значение разведения-восстановления 117%.

Специфичность

Перекрестная реактивность с L-тироксином T4 была очень низкой, неопределяемой.

Ограничения

Реактивы, предоставленные в данном наборе, оптимизированы для измерения T₃ в сыворотке крови.

Следует избегать повторного замораживания и размораживания реактивов и образцов.

Не следует использовать гемолизованные и липемические образцы, так как они могут дать ложные значения.

Полученные результаты должны быть интерпретированы только в соответствии с общей клинической картиной. Ни один из диагностических наборов не может быть использован в качестве единственного доказательства наличия какого-либо заболевания или нарушения.

Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Пробирки для проведения исследования упакованы в пластиковые коробки и не промаркированы индивидуально. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не перепутать их с обычными пробирками. Для минимизации риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо для проведения исследования, а после выполнения работы класть их обратно в коробку. Пробирки для количественного определения рекомендуется помечать маркером.

2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения, пробирки следует плотно установить на штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное встряхивание может стать причиной низкой эффективности количественного определения.

Дополнительная информация

Не следует смешивать между собой или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, которые используются в наборе, были получены от здоровых доноров. Они были подвергнуты индивидуальным исследованиям с использованием утвержденных методик (ФИА, ферментативный иммуноферментный анализ), по результатам которых были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1) и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg).

При работе с образцами, полученными от человека, которые подлежат исследованию с использованием диагностических наборов, необходимо всегда соблюдать осторожность. Даже если пациент прошел необходимые обследования, ни один из методов не может дать полной гарантии отсутствия вируса гепатита В, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и других инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека необходимо обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Химическая опасность















В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 30 мг.

Содержание Kathon CG в каждой упаковке составляет 30 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C.

Срок годности: 60 дней с момента готовности.

	Использовать до		Номер партии
	Хранить при температуре		Контроль
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Стандарт
	Биологическая опасность. Обратитесь к инструкции по использованию In vitro диагностического набора		Пробирка с покрытием
	Инструкция по использованию		Метка
	ИВД		Производитель
	REF		
	Радиоактивный материал		



Сайт: <http://www.izotop.hu>
Технический e-mail: immuno@izotop.hu
Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu



INSTITUTE OF ISOTOPES LTD.
1535 Budapest. Pf.: 851.
тел.: (+36-1)392-2577,
факс: (+36-1)395-9247
01363