EN ISO 13485

Унитарное предприятие
«Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РИА-ТЕСТОСТЕРОН-СТ

ТУ РБ 03535291.016-96 изм.6

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь

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

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор РИА-ТЕСТОСТЕРОН-СТ предназначен для определения концентрации тестостерона в сыворотке крови человека методом радиоиммунологического анализа. Набор предназначен для применения только in vitro.

1.2 Тестостерон – андроген, синтезируемый у мужчин клетками Лейдига семенников, а у женщин корой надпочечников и стромой яичников. Измерение уровня тестостерона используется при исследовании причин пониженной секреции андрогенов у мужчин и гиперандрогении у женщин. Количественное определение тестостерона необходимо для диагностики и контроля за лечением нарушений функций репродуктивной системы.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 Состав набора:

- [^{125}I]-тестостерон, жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 53 мл, общая активность (70-150) кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к тестостерону, готовы к использованию, 100 шт.;
- шесть калибровочных проб в диапазоне концентраций тестостерона (0; 1-100) нмоль/л (точные значения концентраций тестостерона указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 6 флаконов по 0,50 мл;
- контрольная сыворотка (КС) содержит известное количество тестостерона (диапазон концентраций тестостерона указывается на этикетке), жидкий препарат, готов к использованию, 1 флакон, 0,50 мл.

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 4 ч.

2.4 Диапазон определяемых концентраций тестостерона (0,5-100) нмоль/л.

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

В пробирки, покрытые моноклональными антителами к тестостерону, вносятся пробы сыворотки крови пациента, контрольная сыворотка и калибровочные пробы, а затем добавляется тестостерон, меченый йодом-125.

Меченый и немеченый антигены конкурируют за ограниченное число участков связывания моноклональных антител, иммобилизованных на стенках пробирки. Реакция антигенов с антителами приводит с течением времени к состоянию равновесия между свободными и связанными антигенами. После инкубации в пределах определенной области концентраций антигенов, количество включившегося в состав иммунных комплексов меченого антигена ([^{125}I]- тестостерон) обратно пропорционально количеству немеченого антигена (эндогенный тестостерон) в пробе.

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

Разделение свободного и связанного антителами тестостерона осуществляют удалением инкубационной среды из пробирок.

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

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [^{125}I]-тестостерон 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 обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при осуществлении деятельности по использованию атомной энергии и источников ионизирующего излучения», утвержденных 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 [1], [2], [3], [4], [5]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [6].

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 [7].

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

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

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.

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.

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

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 (2-8) °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности.

8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к тестостерону маркировать следующим образом (в дубликатах):

B_0-B_5 – для калибровочных проб тестостерона;

$B_{КС}$ – для КС;

B_X – для исследуемых проб сыворотки крови человека.

8.2 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.

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

8.4 Содержимое пробирок инкубировать в течение 3 ч при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний/мин) на приборе для встряхивания пробирок при температуре (18-25) °С.

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

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

8.7 Последовательность операций анализа приведена в таблице 1.

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

Таблица 1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	Калибровочные пробы, КС и исследуемые сыворотки крови человека, мл	[^{125}I]-тестостерон, мл	Инкубировать 3 ч при постоянном встряхивании при температуре (18-25) °С	Тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса
B_0-B_5	0,05	0,5		
$B_{КС}$	0,05	0,5		
B_X	0,05	0,5		
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.

9.2 Рассчитать величину $(Bi/B_0)\times100$, в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной сыворотки или исследуемой сыворотки крови человека, где Bi – среднее арифметическое значение скорости счета [^{125}I] в пробирках B_1-B_5, $B_{КС}$ 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 тестостерона, в нмоль/л, в соответствующих калибровочных пробах; либо в координатах logit-log.

9.4 Определить по калибровочному графику концентрацию тестостерона, в нмоль/л, в КС и исследуемых сыворотках крови человека.

Для перевода молярной концентрации тестостерона в массовую следует пользоваться соотношением:

мкг/л = нмоль/л × 0,362

10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

10.1 Чувствительность

Минимальная концентрация тестостерона, определяемая с помощью набора, составляет не более 0,5 нмоль/л.

10.2 Специфичность

Перекрестная реакция моноклональных антител к тестостерону со структурными аналогами тестостерона приведена в таблице 2.

Таблица 2

Исследуемые вещества	Перекрестная реакция, %
Тестостерон	100
5-Дигидротестостерон	9
11-Гидрокситестостерон	1
5-Андростан-3,17-диол	1
Дигидроэпиандростерон сульфат	0,01
Дигидроэпиандростерон	0,008
Андростерон	0,08

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

Прогестерон	0,03
11-Гидроксипрогестерон	0,03
Кортизол	0,01
Дезоксикортикостерон	0,03
Кортикостерон	0,002

10.3 Воспроизводимость результатов

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

10.4 Тест на «открытие»

Процент «открытия» тестостерона, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией тестостерона, составляет (80-120) %.

10.5 Клиническая проверка набора

Концентрация тестостерона в сыворотке крови, определяемая с помощью набора, составляет: мужчины (8-32) нмоль/л, женщины – менее 5 нмоль/л.

Приведенные значения являются ориентировочными. Рекомендуется в каждой лаборатории установить собственные уровни тестостерона, 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 Для отбора и добавления компонентов рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и воспроизводимость результатов пипетирования.

11.4 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

Библиография

[1] Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД. Утвержден приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351

[2] 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

[3] Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2017 г. № 2

[4] Санитарные нормы и правила «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2013 г. № 11

[5] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165
«О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения»

[6] 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.

[7] Санитарные нормы и правила «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при обращении с радиоактивными отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.12.2015 г. № 142

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

Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
	**Знак радиационной опасности** Настоящий символ сопровождается указанием общей активности изотопа [^{125}I] в наборе, кБк
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**
	**Содержимого достаточно для проведения n-тестирований** Настоящий символ сопровождается указанием количества определений
	**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

 УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»
ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3,
220141, г. Минск, Республика Беларусь
Тел./факс +375-17-272-52-57
E-mail: hopmang.bel@gmail.com, http://www.hopiboh.org
По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в ОТК,
тел. +375-17-396-87-38

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

Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
	**Знак радиационной опасности** Настоящий символ сопровождается указанием общей активности изотопа [^{125}I] в наборе, кБк
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**
	**Содержимого достаточно для проведения n-тестирований** Настоящий символ сопровождается указанием количества определений
	**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

 УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»
ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3,
220141, г. Минск, Республика Беларусь
Тел./факс +375-17-272-52-57
E-mail: hopmang.bel@gmail.com, http://www.hopiboh.org
По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в ОТК,
тел. +375-17-396-87-38

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