

Приложение Б  
(Обязательное)

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

Б.1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Б.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*.

Б.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.

Б.2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Б.2.1 Состав набора:

- [<sup>125</sup>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.

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

Б.2.3 Продолжительность анализа 4 ч.

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

Б.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 ( $[^{125}\text{I}]$ -тестостерон) обратно пропорционально количеству немеченого антигена (эндогенный тестостерон) в пробе.

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

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

### Б.3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Б.3.1  $[^{125}\text{I}]$ -тестостерон является источником мягкого гамма-излучения.

Период полураспада изотопа  $[^{125}\text{I}]$  - 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.

Б.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.

Б.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].

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

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

### Б.4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

Б.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.

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

Б.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.

## Б.5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Б.5.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- гамма-счетчик колодезного типа, позволяющий измерять активность изотопа [<sup>125</sup>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.

## Б.6 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Б.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.

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

достижения однородности.

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

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

## Б.7 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

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

Б.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.

## Б.8 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

В<sub>0</sub>-В<sub>5</sub> - для калибровочных проб тестостерона;

В<sub>КС</sub> — для КС;

В<sub>х</sub> - для исследуемых проб сыворотки крови человека.

Б.8.2 В пробирки В<sub>0</sub>-В<sub>5</sub> внести по 0,05 мл (50 мкл) соответствующих калибровочных проб. В пробирки В<sub>КС</sub> внести по 0,05 мл (50 мкл) контрольной сыворотки. В пробирки В<sub>х</sub> внести по 0,05 мл (50 мкл) исследуемых сывороток крови человека.

Б.8.3 Во все пробирки внести по 0,5 мл (500 мкл) [<sup>125</sup>I]-тестостерона.

Б.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.

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

Б.8.6 Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [<sup>125</sup>I] в каждой пробирке в течение 1 мин.

Б.8.7 Последовательность операций анализа приведена в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Пробирки (в дубликатах)	Последовательность операций			
	Калибровочные пробы, КС и исследуемые сыворотки крови человека, мл	[ <sup>125</sup> I]-тестостерон	Инкубировать 3 ч при постоянном встряхивании при температуре (18-25)°С	Тщательно удалить из всех пробирок жидкость с помощью водоструйного насоса
В <sub>0</sub> -В <sub>5</sub>	0,05	0,5		
В <sub>КС</sub>	0,05	0,5		
В <sub>Х</sub>	0,05	0,5		

Измерить скорость счета [<sup>125</sup>I] в каждой пробирке в течение 1 мин

## Б.9 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

Б.9.1 Найти средние арифметические значения скоростей счета [<sup>125</sup>I] для каждой пары пробирок.

Б.9.2 Рассчитать величину  $(V_i/V_0) \times 100$ , в процентах, для каждой калибровочной пробы, контрольной сыворотки или исследуемой сыворотки крови человека, где  $V_i$  - среднее арифметическое значение скорости счета [<sup>125</sup>I] в пробирках В<sub>1</sub>-В<sub>5</sub>, В<sub>КС</sub> и В<sub>Х</sub>.

Б.9.3 Построить калибровочный график в полулогарифмических координатах, откладывая на оси ординат (линейная) значения  $(V_i/V_0) \times 100$ , в процентах, а по оси абсцисс (логарифмическая) - значения концентраций тестостерона, в нмоль/л, в соответствующих калибровочных пробах; либо в координатах logit-log.

Б.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:

$$\text{мкг/л} = \text{нмоль/л} \times 0,362$$

## Б.10 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### Б.10.1 Чувствительность

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

### Б.10.2 Специфичность

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

Таблица Б.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
Прогестерон	0,03
11-Гидроксипрогестерон	0,03

Кортизол	0,01
Дезоксикортикостерон	0,03
Кортикостерон	0,002

### Б.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%.

### Б.10.4 Тест на «открытие»

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

### Б.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.

## Б. 11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА



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





Б.11.2 Срок годности набора - 60 суток.

Б.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.

Б.11.4 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

### Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
<b>SN</b>	<b>Серийный номер</b> Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	<b>Использовать до</b> 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
<b>IVD</b>	<b>Изделие для диагностики in vitro</b>
	<b>Ограничение температуры</b> Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона

	<p><b>Изготовитель</b> Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя</p>
	<p><b>Обратитесь к руководству по эксплуатации</b> Настоящий символ отсылает к руководству по эксплуатации для получения информации, необходимой для надлежащего применения изделия</p>
	<p><b>Содержимого достаточно для проведения n-тестирований</b> Настоящий символ сопровождается указанием количества определений</p>
	<p><b>Знак радиационной опасности</b> Настоящий символ сопровождается указанием общей активности изотопа [<sup>125</sup>I] в наборе, кБк</p>



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](mailto:hopmang.bel@gmail.com), <http://www.hopiboh.org>

По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в ОТК, тел. +375-17-396-87-38

Приложение В  
(Справочное)  
Библиография

- [1] Нормы МАГАТЭ по безопасности для защиты людей и охраны окружающей среды, № TS-R-1-1  
Правила безопасной перевозки радиоактивных материалов, 2009 г.
- [2] Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД. Утвержден приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351
- [3] СП 17-69 РБ-98  
«Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1999 г. № 18
- [4] Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению и учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2017 г. № 2
- [5] Санитарные нормы и правила «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерств здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2013 г. № 11
- [6] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165  
«О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения»
- [7] 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 согласован Госстандартом Республики Беларусь 10.09.2002 г.
- [8] Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29.07.2019 г. № 74 «О проведении обязательных и внеочередных медицинских осмотров работающих»
- [9] Санитарные нормы и правила «Требования к обеспечению радиационной безопасности персонала и населения при обращении радиоактивными отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.12.2015 г. № 142