



Унитарное предприятие
"Хозрасчетное опытное производство
Института биорганической химии
Национальной академии наук Беларуси"
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. академика Купревича, 5, корп.3
Факс (37517) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

РИА-ТЕСТОСТЕРОН-СТ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ № ИМ-7.2615/1204 от 30.04.2012 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор РИА-ТЕСТОСТЕРОН-СТ предназначен для количественного определения тестостерона в сыворотке крови человека методом радиоиммунологического анализа.

Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2 Тестостерон синтезируется главным образом в семенниках, а также в существенно меньших количествах, в яичниках и коре надпочечников. 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, готовый к использованию, 55 мл, 1 флакон, общая активность – (70-150) кБк;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к тестостерону, готовы к использованию, 100 шт.;
- калибровочные пробы (на основе сыворотки крови человека), содержащие известные количества тестостерона в диапазоне концентраций (0; 1–100) нмоль/л (точные значения концентраций тестостерона указаны на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовы к использованию, 6 флаконов по 0,5 мл;
- контрольная сыворотка (далее - КС), лиофилизованный препарат, 1 флакон.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных проб, 1 пробы общей активности [^{125}I]-тестостерона, 6 калибровочных проб и 1 пробы КС, всего 100 определений.

2.3 Продолжительность анализа 4 ч. Диапазон определяемых концентраций тестостерона (0,5-100) нмоль/л.

2.4 Принцип метода состоит в следующем. В аналитической пробирке, содержащей компоненты набора и образец сыворотки крови, во время инкубации устанавливается равновесие между [^{125}I]-тестостероном и эндогенным гормоном анализируемого образца сыворотки крови с антителами, иммобилизованными на стенках пробирки. Количество связанного антителами [^{125}I]-тестостерона находится в обратной зависимости от концентрации тестостерона в анализируемом образце. Разделение свободного и связанного антителами тестостерона осуществляют удалением инкубационной среды из пробирок с помощью водоструйного насоса.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 [^{125}I]- тестостерон является источником мягкого гамма-излучения. Период полураспада изотопа [^{125}I] – 60,1 суток.

3.2 При работе с набором следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами (РВ) (Нормы радиационной безопасности ГН 2.6.1.8-127 и Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности СанПиН 2.6.1.8-8).

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 одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые 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 [1], [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

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

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

4.1 Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,05 мл и 0,5 мл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);

- прибор для встряхивания пробирок;
- вихревой смеситель;
- штатив для пробирок;
- гамма-счетчик, позволяющий измерять активность изотопа [^{125}I];
- водоструйный насос;
- перчатки резиновые хирургические;
- дистиллированная вода.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

5.1 Перед использованием выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

5.2 Во флакон, содержащий КС, внести 0,5 мл дистиллированной воды. Через 10 минут тщательно перемешать содержимое, избегая образования пены. При вскрытии и растворении необходимо следить, чтобы на пробке не осталось сухого вещества.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Аналитические пробирки поместить в штатив и каждую пару пробирок маркировать обозначением той величины, для измерения которой они предназначены: Т – для измерения общей активности [^{125}I]-тестостерона; $V_0 - V_5$ – для калибровочных проб; $V_{КС}$ – для КС; V_x – для исследуемых образцов сыворотки крови пациентов.

6.2 Отобрать из каждого флакона с калибровочными пробами по 0,05 мл сыворотки и внести в пробирки $V_0 - V_5$. Из флакона с КС отобрать по 0,05 мл и внести в пробирки $V_{КС}$. В пробирки V_x внести по 0,05 мл исследуемых образцов сыворотки крови пациентов.

6.3 Во все пробирки внести по 0,5 мл раствора [^{125}I]-тестостерона.

6.4 Инкубировать все пробирки при постоянном встряхивании (не менее 350 встряхиваний в мин.) в течение 3 ч при температуре (18-25) °С.

6.5 Из всех пробирок, кроме Т, тщательно удалить содержимое с помощью водоструйного насоса.

6.6 Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [¹²⁵I] в каждой пробирке в течение 1 минуты.

6.7 Схема анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1

Пробирки (вдубликатах)	Последовательность операций		
	Калибровочные пробы, КС, исследуемые образцы, мл	[¹²⁵ I]-тестостерон, мл	Инкубировать при постоянном встряхивании в течение 3 ч и температуре (18-25) °С. Из всех пробирок, кроме Т, тщательно удалить содержимое с помощью водоструйного насоса.
Т	-	0,5	
В ₀ -В ₅	0,05	0,5	
В _{КС}	0,05	0,5	
В _Х	0,05	0,5	

Все пробирки поместить в гамма-счетчик и измерить скорость счета [¹²⁵I] в каждой пробирке в течение 1 минуты.

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Найти среднее арифметическое значение скорости счета [¹²⁵I]-тестостерона для каждой пары пробирок.

7.2 Рассчитать соотношение $V_0/T \times 100$, в процентах, где V_0 – средняя скорость счета в пробирках, содержащих калибровочную пробу S_0 ; T – общая активность [¹²⁵I]-тестостерона, измеряемая средней скоростью счета в пробах T .

7.3 Рассчитать соотношение $V_i/V_0 \times 100$, в процентах, для каждой пары пробирок, где V_i – средняя скорость счета в пробирках, содержащих калибровочные, контрольную и исследуемые образцы.

7.4 В полулогарифмических координатах (ось абсцисс – логарифмическая, ось ординат – линейная) или координатах "logit-log" построить график зависимости $V_i/V_0 \times 100$, в процентах, (ось ординат) от концентрации тестостерона (ось абсцисс) в калибровочных пробах.

Для исследуемых образцов и КС на основании соответствующих значений V_i/V_0 , в процентах, по калибровочному графику определить содержание тестостерона.

Для перевода молярной концентрации тестостерона в массовую следует пользоваться соотношением:

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

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность

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

8.2 Чувствительность

8.2.1 Минимальная достоверно определяемая концентрация тестостерона составляет 0,5 нмоль/л.

8.3 Воспроизводимость результатов

8.3.1 Коэффициент вариации при измерении тестостерона в образцах сыворотки крови не превышает 8%.

8.4 Тест на «открытие»

8.4.1 "Открытие" стандартной добавки тестостерона в образцах сыворотки крови с известным содержанием эндогенного гормона составляет (90-110) %.

8.5 Клиническая проверка

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

8.6 Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций тестостерона соответствующие нормальным.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1 Набор должен храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности. Компоненты набора, подготовленные к работе (см.п.5.2), могут храниться при температуре (2-8) °С в течение 3 суток.

9.2 ВНИМАНИЕ! Не использовать компоненты наборов разных серий.

9.3 Исследуемые образцы сыворотки крови следует проверить на остаточную радиоактивность, если обследуемому лицу до отбора крови вводили радиоактивные препараты.

9.4 Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

9.5 Определяемые образцы сыворотки крови человека можно хранить при температуре не менее минус 20 °С в течение длительного времени. Допускается только однократное размораживание образцов.

9.6 Для отбора и добавления реагентов набора рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки, аттестованные на точность по значению средней дозы и сходимость результатов пипетирования.

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

Библиография

- [1] Приказ МЗ РБ №351 от 16.12.98 г. «Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧСПИД».
- [2] СП 17-69 РБ 98
Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний.
- [3] Приказ МЗ РБ №165 от 25.11.2002 г.
О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения.