

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Департамента
государственного контроля качества,
эффективности, безопасности лекарственных
средств и медицинской техники МЗ РФ

_____ Р.У. Хабриев

«8» ноября 2000 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КОРТИЗОЛА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

(СтероидИФА-кортизол-01)

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов
для иммуноферментного (неинфекционные),
радиоиммунологического и других видов
иммунохимического анализа Комитета
по новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 8 от 18 сентября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,
УТВЕРЖДЕННОЙ 30 июля 1995 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СтероидИФА-кортизол-01» предназначен для количественного определения концентрации кортизола в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Кортизол — стероидный гормон с молекулярной массой 362Да. Количественное определение уровня кортизола в крови имеет диагностическое значение при оценке функционирования системы гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников. Особую важность определение кортизола имеет при таких заболеваниях, как болезнь Аддисона и болезнь Иценко-Кушинга.

1.3. Набор «СтероидИФА-кортизол-01» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

Примечание: В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Принцип работы набора состоит в следующем. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата кортизол-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным кортизолом сыворотки крови за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами кортизола и конъюгата кортизол-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству кортизола в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата кортизол-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация кортизола в определяемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к кортизолу, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к кортизолу» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества кортизола; значения концентраций кортизола в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат кортизол-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл).

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

4.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к кортизолу с другими стероидами приведена в таблице.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения кортизола в одном и том же образце с использованием набора «СтероидИФА-кортизол-01» не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации кортизола в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей кортизол, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2–№ 6 и составляет $\pm 10\%$.

Таблица

СТЕРОИД	Перекрестная реакция, %
Кортизол	100,0
Преднизолон	6,0
11-Дезоксикортизол	0,9
Кортикостерон	0,6
Дезоксикортикостерон	<0,1
Прогестерон	<0,1
Тестостерон	<0,1
Эстрадиол	<0,1
Эстриол	<0,1

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» кортизола — соответствие измеренной концентрации кортизола предписанной в пробе,

полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация кортизола в сыворотке крови человека не превышает 5 нмоль/л.

4.6. Клиническая проверка. Содержание кортизола измеряли в сыворотке крови взятой с 9 до 11 часов у 40 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Средняя концентрация кортизола составила 378 нмоль/л (150–660 нмоль/л).

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций кортизола, соответствующие нормальным.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г).

5.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.5. Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл и на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 200 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 300 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к пробкам. Открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5мл дистиллированной воды и закрыть пробки. Выдержать флаконы в течение 10минут при комнатной температуре (+18...25°C). Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

7.2. Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.3. Промывочныйбуфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10раз. Например:
5мл БуфераР + 45мл дистиллированной воды.
Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5суток. Оставшийся неиспользованным БуферР хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.4. Конъюгат кортизол-пероксидаза готов к использованию.

7.5. Раствор ТМБ готов к использованию.

7.6. Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На последней странице приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — №2 для калибровочной пробы №1;

C1, C2 — №3 для калибровочной пробы №2;

D1, D2 — №4 для калибровочной пробы №3;

E1, E2 — №5 для калибровочной пробы №4;

F1, F2 — №6 для калибровочной пробы №5;

G1, G2 — №7 для калибровочной пробы №6;

H1, H2 — № 8 для контрольной сыворотки.

8.3. Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

8.4. Во все лунки, кроме A1 и A2, немедленно внести по 150 мкл конъюгата кортизол-пероксидаза.

8.5. Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 1 часа в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.3, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.7. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.8. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 мин.

8.9. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов необходимо использовать формулу $V/B_0 \times 100\%$ для каждой калибровочной или исследуемой пробы, где V — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, B_0 — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу 0 нмоль/л. В координатах «logit-log» построить для калибровочных проб график зависимости $V/B_0 \times 100\%$ от концентрации кортизола в калибровочных пробах (нмоль/л).

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой $(V - V_T)/(B_0 - V_T) \times 100\%$, где V_T — среднее значение оптической плотности лунок A1 и A2.

Определить содержание кортизола в пробах по калибровочному графику.

8.10. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение **20 минут** при температуре +2...8°C.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Набор «СтероидИФА-кортизол-01» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат кортизол-пероксидаза и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5суток при комнатной температуре (+18...25°C);
- БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в течение всего срока годности при температуре +2...8°C.

9.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

9.3. При вскрытии и растворении лиофилизированных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации кортизола в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «СтероидИФА-кортизол-01» обращаться по адресу: 189650, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д.70/4, телефон/факс: (812) 596-76-80, или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14 А, телефон (095) 120-60-95.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п.8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
КП № 1, мкл	—	50	—	—	—	—	—	—	—
КП № 2, мкл	—	—	50	—	—	—	—	—	—
КП № 3, мкл	—	—	—	50	—	—	—	—	—
КП № 4, мкл	—	—	—	—	50	—	—	—	—
КП № 5, мкл	—	—	—	—	—	50	—	—	—
КП № 6, мкл	—	—	—	—	—	—	50	—	—
КС, мкл	—	—	—	—	—	—	—	50	—
С _х , мкл Конъюгат	—	—	—	—	—	—	—	—	50
кортизол- пероксидаза, мкл	—	150	150	150	150	150	150	150	150
Инкубация № 1 4-кратная	1 час, термостатируемый шейкер, +37°C								
промывка: промывочный буфер, мкл	4х	4х	4х	4х	4х	4х	4х	4х	4х
Раствор ТМБ, мкл	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Инкубация № 2 Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	КТ, темное место, 15–30 мин.								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Шейкер, 1–2 мин.								
Расчет результатов	Фотометр, 450 нм Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания: КП — калибровочная проба;
 КС — контрольная сыворотка;
 С_х — анализируемые пробы;
 ОП — оптическая плотность;
 КТ — комнатная температура (+18...25°C).

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Алкор Био»:
 зав. лабораторией биотехнологии В.А. Головаченко
 и ген. директором, к.б.н. Д.Г. Полынцевым