

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 2009 г.
№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические
системы»


М. Е. Колосов
«28» августа 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ по применению

**набора реагентов для количественного определения кортизола методом
иммуноферментного анализа
(ДС-ИФА-Стероид-Кортизол)**

1. Назначение

1.1. Набор реагентов ДС–ИФА-Стероид–Кортизол предназначен для количественного определения содержания кортизола в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Кортизол – стероидный гормон с молекулярной массой 362 Да, является основным гормоном коры надпочечников. В крови кортизол циркулирует в основном в связанной с транскортином форме. Секреция кортизола подчиняется суточному ритму – максимальная концентрация кортизола в 6 – 9 ч утра, минимальная – в 22 – 24 ч. Количественное определения уровня кортизола в крови имеет диагностическое значение при оценке функционирования системы гипоталамус – гипофиз – кора надпочечников. Определение уровня секреции кортизола является важным при диагностике болезней Аддисона, Иценко-Кушинга.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 48 проб (40 неизвестных проб, шесть калибровочных проб, одна проба контрольной сыворотки, одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора) при одновременном использовании всех стрипов планшета.

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех калибровочных проб при каждой постановке; набор может быть использован в течение месяца после вскрытия реагентов набора.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата кортизол-пероксидаза, во время инкубации происходит конкурентное связывание сывороточного кортизола и кортизола, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к кортизолу, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами конъюгата кортизол-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально концентрации кортизола в анализируемом образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором 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 исследуемых образцах.

2.2. Состав набора:

– иммуносорбент –полистироловый 96-луночный разборный планшет (12 стрипов по 8 лунок каждый) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к кортизолу, маркирован «Иммуносорбент» — 1 шт;

– конъюгат - кортизол, меченный пероксидазой хрена, маркирован

«Конъюгат» — 1 фл. (12 мл);

– 6 калибровочных проб на основе сыворотки крови человека, содержащих известные количества кортизола: 0 нмоль/л; 15 нмоль/л; 90 нмоль/л; 400 нмоль/л; 800 нмоль/л и 1800 нмоль/л; концентрации кортизола в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетке флакона и в паспорте на набор – 6 фл. (по 0,5 мл);

– контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола, маркирована «Контрольная сыворотка» – 1 фл. (0,5 мл);

– промывочный раствор, 25-кратный концентрат, маркирован «ПР» – 1 фл. (50 мл);

– ТМБ-Субстратный раствор – 1 фл. (12 мл);

– стоп-реагент (0,2 М серная кислота), маркирован «Стоп-реагент» – 1 фл. (15 мл);

– бланк для построения калибровочной кривой – 1 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным разборным планшетам;
- одноразовые наконечники к полуавтоматическим пипеткам;
- пластиковая ванночка для реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

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

3.2. Специфичность. Величины перекрестных реакций с родственными соединениями приведены в таблице.

Таблица

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
кортизол	100
кортизон	0,47
кортикостерон	10,7
тестостерон	0,27
эстрадиол	<0,001
эстриол	<0,001
прогестерон	4,6
андростендион	0,1

3.3. Коэффициент вариации результатов определения кортизола в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора не превышает 8 %.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации кортизола в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой 0 нмоль/л имеет линейный характер в диапазоне концентраций 15-1800 нмоль/л и составляет ± 10 %.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» кортизола - соответствие измеренной концентрации кортизола предписанной в пробе, полученной смешением равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 90 нмоль/л. Процент открытия составляет 90 – 110 %.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию кортизола измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч у 95 здоровых людей в возрасте от 21 до 40 лет. Средняя концентрация кортизола в крови составила 331 нмоль/л (63 – 600 нмоль/л).

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций кортизола, соответствующие нормальным значениям для обследуемого контингента лиц.

4. Меры предосторожности.

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. 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.).

4.4. Стоп-реагент представляет собой 0,2 М раствор серной 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.

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

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

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

5. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

– спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;

– термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание планшета при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ со скоростью от 500 до 800 об/мин;

– устройство для промывания планшета;

– дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50

мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;

– дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

– цилиндры мерные вместимостью 200 мл и 500 мл;

– стакан стеклянный вместимостью 500 мл;

– вода дистиллированная;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– перчатки резиновые или пластиковые.

6. Подготовка исследуемых образцов сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Недопустимо использование образцов сыворотки крови с добавлением азида натрия или тимеросала в качестве консерванта! Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2 - 8 °С не более 3 суток или при температуре минус 20° С и ниже не более 3 месяцев (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией анализировать нельзя! Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 минут при температуре 2 - 8 °С.

7. Подготовка реагентов для анализа

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и анализируемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре (18 - 25 °С) в течение времени не менее 30 минут.

7.2. Иммуносорбент. **Внимание:** во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре (18 - 25 °С) в закрытом пакете не менее 30 минут.

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и переставить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы поместить в тщательно герметизированный пакет и хранить при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом ПР тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл дистиллированной воды). Полученный раствор тщательно перемешать.

7.4. Конъюгат, калибровочные пробы, контрольная сыворотка, ТМБ-Субстратный раствор и стоп-реагент готовы к применению.

8. Проведение анализа.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры.

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

A1, A2 - № 1 для измерения величины оптической плотности (ОП) калибровочной пробы 0 нмоль/л;

B1, B2 - № 2 для измерения величины ОП калибровочной пробы 15 нмоль/л;

C1, C2 - № 3 для измерения величины ОП калибровочной пробы 90 нмоль/л;

D1, D2 - № 4 для измерения величины ОП калибровочной пробы 400 нмоль/л;

E1, E2, - № 5 для измерения величины ОП калибровочной пробы 800 нмоль/л;

F1, F2 - № 6 для измерения величины ОП калибровочной пробы 1800 нмоль/л;

G1, G2 - № 7 для измерения величины ОП контрольной сыворотки;

H1, H2 - № 8 для измерения величины ОП раствора ТМБ-Субстратного раствора.

Внести в соответствующие лунки по 25 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в остальные лунки – по 25 мкл исследуемых сывороток крови в дубликатах.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

8.3. Во все лунки планшета, кроме H1 и H2, внести по 100 мкл конъюгата, закрыть планшет крышкой и инкубировать на шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин в течение 30 минут при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

8.4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала, планшет промыть 5 раз рабочим ПР (см. п. 7.3), добавляя во все лунки планшета по 300 мкл рабочего ПР и удаляя рабочий ПР с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала. После последнего промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Немедленно внести во все лунки планшета по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре $(18 - 25 ^\circ\text{C})$ в течение 20 – 30 минут в зависимости от степени развития окраски.

8.6. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и ТМБ-Субстратный раствор, по 150 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции и встряхнуть планшет на шейкере в течение 20 секунд.

9. Регистрация результатов

Измерить на фотометре вертикального сканирования ОП раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм.

Если по техническим причинам невозможно измерить ОП растворов в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.6., следует иметь в виду, что окраска раствора в лунках планшета стабильна в течение времени не более 20 минут при комнатной температуре (18 – 25 °С).

10. Учет результатов

Если программа фотометра позволяет вычитать величину ОП в лунках Н1 и Н2 из значений ОП всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать формулу $V/V_0 \cdot 100\%$ для каждой калибровочной или исследуемой пробы, где V – среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. Если программа фотометра не позволяет вычитать величину ОП в лунках Н1 и Н2, то необходимо пользоваться формулой $(V - V_T)/(V_0 - V_T) \cdot 100\%$, где V_T – среднее арифметическое значение величины ОП в лунках Н1 и Н2.

Построить в координатах «logit-log» калибровочный график зависимости V/V_0 в процентах от концентрации кортизола в калибровочных пробах (нмоль/л). Определить содержание кортизола в исследуемых пробах по калибровочному графику.

Определение концентрации кортизола в контрольной сыворотке необходимо для проверки точности и достоверности полученных результатов. В том случае, когда полученное значение концентрации в контрольной сыворотке находится в пределах концентраций, указанных на этикетке флакона с контрольной сывороткой, полученные при анализе исследуемых проб результаты являются достоверными.

11. Условия хранения и эксплуатации набора

11.1. Набор реагентов ДС-ИФА-Стероид-Кортизол должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2 - 8 °С в течение всего срока годности (13 месяцев). Допускается хранение наборов при температуре до 25 °С не более 10 сут.

11.2. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

