

## ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення кортизолу

### (Кортизол–БЕСТ)

#### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «Кортизол–БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення кортизолу у сироватці крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір «Кортизол–БЕСТ» рекомендований для проведення аналізу в дублікатах 40 невідомих, 6 калібрувальних проб, однієї проби контрольної сироватки й однієї проби для визначення оптичної густини розчину тетраметилбензидину (ТМБ) при використанні всіх стрипів одночасно. У випадку дробового застосування необхідна обов'язкова постановка всіх каліброваних проб для кожного окремого аналізу.

#### 2. СКЛАД НАБОРУ

Планшет - полістирольний, з іммобілізованими антитілами до кортизолу

1 упаковка.

Кон'югат – кортизол - пероксидаза

1 флакон

Калібрувальні проби (КП): **7 флаконов**

КП№1- 1 флакон, 0,5 мл, містить 0 нмоль/л кортизолу,

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, містить 20 нмоль/л кортизолу,

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, містить 60 нмоль/л кортизолу,

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, містить 200 нмоль/л кортизолу,

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, містить 600 нмоль/л кортизолу,

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, містить 2000 нмоль/л кортизолу,

КП №7 1 флакон, 0,5 мл, містить 2800 нмоль/л кортизолу

КС (контрольна сироватка) містить відому кількість кортизолу, діапазон концентрацій зазначений на етикетці флакону. 1 флакон

Промиваючий розчин

1 флакон

ТМБ (Розчин тетраметилбензидина)

1 флакон

СР (Стоп-реагент)

1 флакон

Перерахунок 1 нмоль/л = 0,288 нг/мл

1 нмоль/л = 0,362319 мкг/л

#### 3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

**3.1. Чутливість.** Мінімальна достовірно обумовлена набором концентрація кортизолу в сироватці крові людини не перевищує 4,5 нмоль/л.

**3.2. Специфічність.** Перехресна реакція антитіл до тестостерону з іншими стероїдами менше 0,6%.

**3.3. Діапазон очікуваних значень.** В нормі у дорослих 145 – 655 нмоль/л

#### 4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не пікетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

#### 5. ОБЛАДНАННЯ Й МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ:

Одно- Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5- 3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

#### 6. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ.

**6.1.** Узяття крові для аналізу слід проводити з використанням стандартних процедур для венозної крові, а зразки сироватки повинні бути звільнені від клітин крові центрифугуванням. Після центрифугування сироватка крові повинна бути перенесена в окрему пробірку.

**6.2.** Слід уникати використання в аналізі плазми крові, гемолізованої, мутної або гіперліпемічної сироватки. Не допускається використання як консервант азиду натрію.

**6.3.** Зразки сироватки крові слід використати протягом 24 годин з моменту отримання за умови їх зберігання при +2...8°C. Для більш тривалого зберігання зразки необхідно заморозити при температурі нижче - 20°C. Уникати повторного заморожування зразків.

#### 7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗІВ

##### 7.1 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ.

**7.1.1.** Стріпи. Перед розтином пакет із стріпами необхідно витримати при кімнатній температурі (+18...25 °C) не менше 30 хвилин. Розкрити пакет і переставити на вільну рамку необхідну кількість стрипів. Залишок упакувати у фольгований пакет та зберігати до кінця терміну придатності при +2...8°C.

- 7.1.2.** Рідкі калібрувальні проби і контрольна сироватка готові до використання. Для відновлення ліофілізованих калібрувальних проб та контрольної сироватки перед розкриттям флаконів легким постукуванням струсити частинки, які прилипли до стінок флаконів або до кришок. Відкрити флакони і покласти кришки перевернутими на суху поверхню. У кожний флакон з калібрувальною пробой та контрольної сироваткою внести по 0,5 мл дистильованої води і закрити кришками. Витримати флакони протягом 10 хвилин при кімнатній температурі без перемішування. Потім, акуратно нахилиючи і обертаючи флакони, перемішати їх вміст до повного розчинення, уникаючи піноутворення. Протягом наступних 10 хвилин витримати флакони при кімнатній температурі, періодично перемішуючи.
- 7.1.3.** Кон'югат готовий до використання. Витрата кон'югата на один стріп складає 1,5 мл
- 7.1.4.** Промиваючий розчин. Необхідну кількість розчину розвести дистильованою водою в 20 разів. Наприклад: 5 мл промиваючого розчину + 95 мл води, що дистильоване. Ретельно перемішати, уникаючи піноутворення.
- 7.1.5.** Розчин тетраметилбензидина (ТМБ) готовий до використання. Витрата ТМБ на один стріп складає 1,15 мл
- 7.1.6.** Стопи-реагент готовий до використання. Витрата стоп-реагенту на один стріп складає 1,15 мл
- 7.1.7.** Всі реагенти перед проведенням аналізу мають бути ретельно перемішані і доведені до кімнатної температури (+18...25 °С).

## 7.2. Постановка аналізу

**7.2.1.** Скласти протокол маркування лунок. Лунки промаркувати наступним чином:

- A1, A2 - № 1 - для вимірювання величини оптичної густини розчину ТМБ;
- B1, B2 - № 2 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 1;
- C1, C2 - № 3 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 2;
- D1, D2 - № 4 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 3;
- E1, E2 - № 5 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 4;
- F1, F2 - № 6 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 5;
- G1, G2 - № 7 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 6;
- H1, H2 - № 8 - для вимірювання величини оптичної густини КП № 7.
- A3, A4 - № 9 - для вимірювання величини оптичної густини контрольної сироватки.

**7.2.2.** Внести у відповідні лунки по 10 мкл каліброваних проб і контрольної сироватки, у лунки, що залишилися, по 10 мкл досліджуваної сироватки крові в дублях.

*Примітка:* Загальний час внесення каліброваних проб, контрольної сироватки й досліджуваних зразків не повинен перевищувати 15 хвилин, щоб уникнути неправильних результатів дослідження.

**7.2.3.** В усі лунки, крім лунок A1 і A2, внести по 100 мкл кон'югату.

**7.2.4.** Інкубувати стріпи при струшуванні протягом 60 хвилин у термо-шейкері при температурі +37°C зі швидкістю 500–800 об/хв. Або 90 хвилин при кімнатній температурі.

**7.2.5.** По закінченню інкубації вилучити вміст лунок у спеціальну ємність для збору інфікованого матеріалу й промити лунки п'ять разів. При кожному промиванні в усі лунки додати по 300 мкл промиваючого розчину, приготовленого згідно п. 7.1.5, з наступним видаленням рідини в ємність для інфікованого матеріалу. По закінченню промивання ретельно вилучити залишки рідини з лунок постукуванням рамки зі стріпами в перевернутому положенні по фільтрувальному паперу до зникнення слідів наявності рідини в лунках стріпів.

**7.2.6.** негайно внести в усі лунки по 100 мкл розчину ТМБ. Інкубувати стріпи в темряві при кімнатній температурі (+18...25°C) протягом 15 хвилин залежно від ступеню розвитку забарвлення.

*Примітка:* максимальна оптична густина не повинна перевищувати меж лінійного виміру спектрофотометра. Робочий діапазон спектрофотометра необхідно уточнювати в паспорті приладу. Рекомендована максимальна оптична густина не більше 2,5 од. ОГ.

**7.2.7.** Зупинити ферментну реакцію додаванням у кожен лунку по 100 мкл стоп-реагенту. Струснути на шейкері протягом 1–2 хв.

**7.2.8.** Якщо неможливо виміряти оптичну густина у лунках планшета безпосередньо після виконання п. 7.2.7, тоді слід мати на увазі, що забарвлення в лунках планшета стабільна не більше 20 хвилин при температурі +18 ... 25.

*Примітка:* максимальна оптична густина не повинна перевищувати меж лінійного виміру спектрофотометра. Робочий діапазон спектрофотометра необхідно уточнювати в паспорті приладу. Рекомендована максимальна оптична густина не більше 2,5 од. ОГ

## 8. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.

**8.1.** Виміряти на фотометрі вертикального сканування ОГ в лунках при довжині хвилі 450 нм.

**8.2.** При реєстрації результату необхідно відняти значення ОГ у лунках A1 і A2 від ОГ усіх останніх лунок.  
*Примітка:* середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках A1 та A2 не повинно перевищувати 0,09 од.ОГ.

## 9. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ.

**9.1.** Побудувати калібровочний графік залежності ОГ від концентрації кортизолу (нмоль/л) в калібровочних пробах (Малюнок). Зовнішній вигляд графіка залежить від способу перетворення вісей.

Примітка: для побудови калібрувального графіка на масштабному папері необхідно використовувати формулу 1 або 2. Якщо програма фотометра дозволяє віднімати величину ОГ в лунках А1 та А2 від значень ОГ усіх останніх лунок, то для розрахунку кожної калібрувальної або досліджуваної проби використовувати формулу (1)

$$B / B_1 \times 100\% ,$$

де  $B$  - значення оптичної густини в лунках, що містять калібрувальні або досліджувані проби ,

$B_1$  - середнє арифметичне значення оптичної густини лунки з калібрувальною пробою №1

Якщо програма фотометра не дозволяє віднімати величину ОГ в лунках А1 та А2, то використовувати формулу (2)

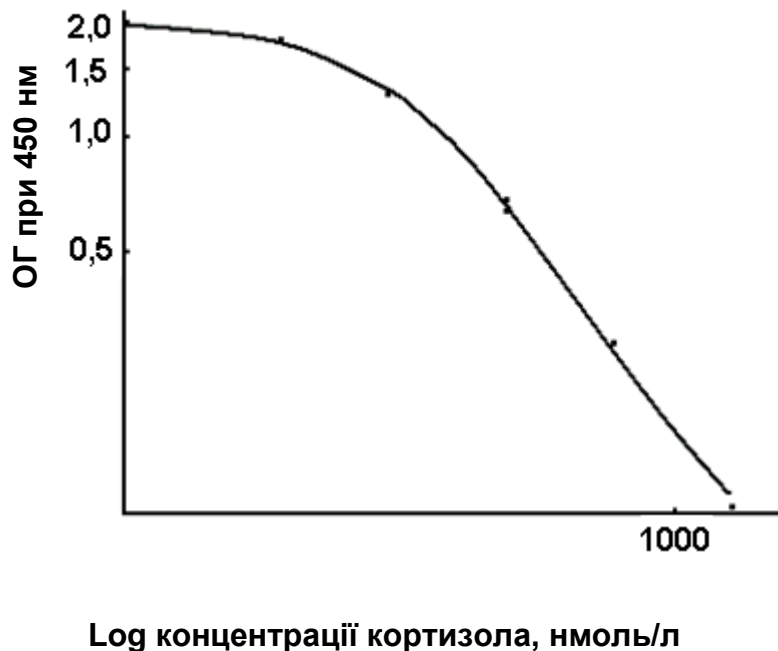
$$(B-B_T) / (B_1-B_T) \times 100\% ,$$

де  $B_T$  - середнє арифметичне значення оптичної густини лунках А1 та А2.

9.2. Визначити зміст кортизолу в пробах за калібрувальним графіком.

9.3. Для зразків сироватки крові з показниками ОГ вище ОГ нульового калібратора ( $B_1$ ) приймати значення концентрації «нижче 10,0 нмоль/л».

9.4. Екстраполяція калібрувального графіка для значень концентрації кортизолу, що перевищують номінал КП №7, не допускається. При наявності таких випадків приймати значення концентрації досліджуваного зразка «вище концентрації КП №7».



#### 10. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

Набір зберігати і транспортувати при (2-8)°С.

Промиваючий розчин підготовлений до використання зберігати не більш 30 діб.

Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 5 діб. Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися: в ТОВ «Бест Діагностик» за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9, тел./факс: (044) 500-57-11 E-mail: [info@bestdiagnostic.com.ua](mailto:info@bestdiagnostic.com.ua)

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції

