«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

_____М.Д. Хусаинов

«28» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации кортизола в сыворотке крови

(Кортизол-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации кортизола в сыворотке крови «Кортизол-ИФА-БЕСТ» предназначен для определения концентрации кортизола в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного образца, 6 калибровочных образцов и 1 контрольного образца, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит конкурентное связывание сывороточного кортизола и кортизола, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к кортизолу, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации кортизола в анализируемых образцах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация кортизола в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «ломающихся» по 1 лунке) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к кортизолу, готовый для использования – 1 шт.;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– калибровочные образцы, содержащие известные количества кортизола – 0; 50; 150; 300; 600 и 1200 нмоль/л, аттестованные относительно NIST Standard Reference Material®971; концентрации кортизола в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов; готовые для использования – 6 флаконов (по 0,5 мл);

– контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола, аттестованный относительно NIST Standard Reference Material®971; готовый для использования – 1 флакон (0,5 мл);

– конъюгат кортизола с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);

– раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл);

– наконечники для дозаторов на 2-200 мкл – 16 шт.

Принадлежности:

– плёнка для заклеивания планшета – 1 шт.;

– трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;

– ванночки для реагентов – 2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемые в наборе моноклональные антитела обеспечивают высокую специфичность выявления кортизола.

Перекрестная реакция антител к кортизолу с другими стероидами приведена в таблице:

СТЕРОИД (концентрация, нмоль/л)	Перекрестная реакция, %
Преднизолон (11097,50 нмоль/л)	6,00
11-Дезоксикортизол (57726,70 нмоль/л)	0,90
Кортикостерон (57726,70 нмоль/л)	0,60
Тестостерон (693433,20 нмоль/л)	0,08
Прогестерон (636010,90 нмоль/л)	0,07
Эстрадиол (734268,30 нмоль/л)	0,07
Эстриол (693529,40 нмоль/л)	0,07

3.2.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определений концентрации кортизола в контрольном образце, не превышает 8%.

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации кортизола при разведении калибровочных образцов, содержащих 1200; 600 и 300 нмоль/л в 2 раза и калибровочного образца 150

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

нмоль/л кортизола – в 3 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации кортизола предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 150 нмоль/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация кортизола рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 минус 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 5,0 нмоль/л.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация кортизола, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 110 условно здоровых мужчин и женщин в возрасте 20-50 лет, находилась в диапазоне 190 – 670 нмоль/л.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации кортизола, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

3.8. Хук-эффект высоких концентраций не был обнаружен вплоть до концентрации кортизола 14000 нмоль/л.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Стоп-реагент и раствор тетраметилбензидина плюс обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора тетраметилбензидина плюс на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды. Калибровочные и контрольный образцы содержат фенол. Конъюгат содержит проклин 150.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

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

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание с частотой 400-800 об/мин и температуре 37 ± 1 °С;

– холодильник бытовой;

– промывочное устройство для планшетов;

– дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объёмы жидкости от 5 до 350 мкл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– флаконы вместимостью 15 мл;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– бумага фильтровальная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать сыворотку крови.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес.

Повторное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты и анализируемые образцы сывороток крови при температуре от 18 до 25°С не менее 30 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°С в течение срока годности набора.

7.2. Подготовка планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к кортизолу.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Промывочный раствор приготовить разведением концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более одного месяца или при температуре от 18 до 25 °С не более 7 дней.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов.

Калибровочные и контрольный образцы готовы для использования и не требуют дополнительного разведения.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов для использования.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Конъюгат, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА, необходимо утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Таблица расхода компонентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс (раствора ТМБ плюс).

Раствор ТМБ плюс готов для использования.

Исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ плюс. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в чистый флакон или ванночку для реагента.

Раствор ТМБ плюс, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА, необходимо утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ плюс необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ плюс, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтроли-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

руемому окислению ТМБ плюс в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7.7. Стоп-реагент готов для использования.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов планшета (см. п. 7.2), по 10 мкл каждого калибровочного образца и по 10 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 10 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Время внесения образцов не должно превышать 10-15 мин при использовании всех лунок планшета.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать флакон или ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37±1 °С.

8.4. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл промывочного раствора в процессе промывки каждого стрипа. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см п. 7.6).

Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать флакон или ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.6. Инкубировать планшет в защищенном от света месте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре 37±1 °С.

8.7. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8.8. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно пре-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

вышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации кортизола в калибровочных образцах (нмоль/л).

9.3. Определить концентрацию кортизола в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.4. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации кортизола в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке флакона.

9.5. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации кортизола в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

Примечание: Образцы, содержащие гемоглобин в концентрации до 5,3 г/л; билирубин в концентрации до 1,97 мг/дл; триглицериды в концентрации до 12,9 г/л и белок в концентрации до 57,5 г/л пригодны для использования.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

– калибровочные и контрольный образцы, конъюгат, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия хранить в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора;

– промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более одного месяца или при температуре от 18 до 25 °С не более 7 дней.

10.5. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации кортизола в контрольном образце.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (раствор ТМБ плюс, ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

10.7. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора **«Кортизол-ИФА-БЕСТ»**, обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36,
комн.211,
тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru