УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от_____2010 г.
№_____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ХЕМА»
_____ Ю. С. Лебедин
11 января 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения кортизола в сыворотке (плазме) крови

«КОРТИЗОЛ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «КОРТИЗОЛ-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации кортизола в сыворотке или плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализ.

1.2. Кортизол – глюкокортикоид с молекулярной массой 362,5 дальтон. Он является основным гормоном коры надпочечников. В периферической крови циркулирует главным образом в форме, связанной с транскортиконом. Секреция кортизола в течении суток не одинакова и подчиняется определенному суточному ритму. У человека максимальные концентрации кортизола (ок. 450 нмоль/л) отмечаются между 6 и 9 часами утра, тогда как к полуночи содержание кортизола резко снижается (ок. 140 нмоль/л). Повышение уровня кортизола в крови наблюдается при следующих состояниях: гормональноактивной опухоли коры надпочечников; вирилизирующей гиперплазии коры надпочечников, синдроме Иценко-Кушинга, АКТГ-продуцирующей опухоли, хирургической операции сердечной недостаточности, сахарном диабете, ожогах, острой боли, электростимуляции, инсулиновой коме, инфекционных заболеваниях, беременности, эстрогенотерапии. Содержание кортизола повышается также при приеме АКТГ, кортикостероидов, этанола, никотина, пероральных контрацептивов. Снижение уровня кортизола отмечено при болезни Аддисона, адреногенитальном синдроме, гипопитуитаризме. Понижение концентрации кортизола вызывает дексаметазон, метирапон, леводопа, этакриновая кислота. Пониженные уровни кортизола во время беременности могут свидетельствовать об анэнцефалии плода.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение уровня кортизола в сыворотке (плазме) крови используется для клинической лабораторной диагностики при оценке функционирования системы гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников. Особую важность определение кортизола имеет при таких заболеваниях, как болезнь Аддисона и болезнь Иценко-Кушинга.

1.4. Область применения - клиническая лабораторная диагностика

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение кортизола основано на использовании конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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

планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к кортизолу. Кортизол из образца конкурирует с конъюгированным кортизолом за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках.

Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации кортизола в исследуемом образце. Концентрацию кортизола в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания кортизола в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- **планшет** 96-луночный стрипированный с сорбированными на внутренней поверхности лунок мышиными моноклональными антителами; готов к использованию - 1 шт.;
- **калибровочные пробы** на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества кортизола– **0; 40; 80; 200; 600; 2000 нмоль/л**; концентрации кортизола в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок (флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (по 0,8 мл каждая);
- **конъюгат**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола; готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);
- **концентрат отмывочного раствора** 21-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);
- **стоп-реагент**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **липкая лента** с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;
- **аналитический паспорт;**
- **Инструкция по применению Набора.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к кортизолу человека с другими аналитами приведена в таблице

Аналит	Перекрестная реакция %
Кортизол	100
11-Дезоксикотизол	0,9
Преднизолон	5,6
Кортикостерон	0,6
11-Дезоксикортикостерон	<0,1
Прогестерон	<0,1
17-Гидроксипрогестерон	<0,1
Тестостерон, Эстрадиол, Эстриол	<0,1
Даназол	<0,01

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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

3.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором «КОРТИЗОЛ-ИФА» концентрация кортизола в сыворотке (плазме) крови не превышает 12 нмоль/л.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания кортизола в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «КОРТИЗОЛ-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации кортизола предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 80 нмоль/л

Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации кортизола в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей кортизол, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 40-2000 нмоль/л и составляет $\pm$ 10,0%.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Исследуемая группа	**Единицы**	
	нмоль/л	
	Нижний предел	**Верхний предел**
Здоровые донары	140	600

В соответствии с требованиями ***GLP*** (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «КОРТИЗОЛ-ИФА» уточнить значения концентрации кортизола, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Меры предосторожности-соблюдение «*Правил 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. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- **фотометр вертикального сканирования**, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- **дозаторы** со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 25-250 мкл;
- **термостат**, поддерживающий температуру +37±0,1 ^{0}C;
- **цилиндр мерный** вместимостью 500 мл;
- **вода дистиллированная**;

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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

- **перчатки** резиновые или пластиковые;

- **бумага** фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18-25 ^{0}C) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}C не более 24 ч или при температуре минус 20 ^{0}C не более 2 недель.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышиные антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов «КОРТИЗОЛ-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации кортизола в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 ^{0}C в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 ^{0}C) не более 2 сут. или при температуре +2-8 ^{0}C не более 10 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 25 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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

7.2. Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата.

7.3. Заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его при постоянном встряхивании в течение 60 мин при температуре +37 ^{0}C.

7.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.5. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 ^{0}C) в течение 10-20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.6. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абцисс (x) – десятичный логарифм концентрации кортизола в калибровочных пробах (нмоль/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб ($ОП_{450}$). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика использовать интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию кортизола в калибровочной пробе 0 нмоль/л к несущественно малой величине, например 0,001 нмоль/л.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание кортизола в исследуемых образцах.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «КОРТИЗОЛ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 ^{0}C в течение всего срока годности (12 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 ^{0}C не более 5 сут.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестных образцов, 6

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью
«ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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

калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;

- оставшиеся неиспользованными стрипы тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 ^{0}C в течение всего срока годности Набора;

- конъюгат, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}C в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}C не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20 ^{0}C в течение всего срока годности Набора;

- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 ^{0}C) не более 5 сут. или при температуре +2-8 ^{0}C не более 30 сут.;

- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора допускается хранить при температуре +2-8 ^{0}C в течение всего срока годности Набора;

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «КОРТИЗОЛ-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА» _____ к. б. н. Д. С. Кострикин
11 января 2010 г. М.П.

«СОГЛАСОВАНО»
Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздрава _____ д.м.н., профессор В. В. Долгов
М.П.

Подпись удостоверяю: специалист по кадровой работе ГОУ ДПО РМАПО Росздрава
подпись

КОПИЯ ВЕРНА
Подпись
Общество с ограниченной ответственностью «ХЕМА»
Генеральный директор
Лебедин Юрий Степанович

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