«УТВЕРЖДАЮ"
Генеральный Директор
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»
_____ Е.Н. Сколль-Энгбертс
«6» февраля 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО КОРТИЗОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА **«Кортизол-Имаксиз (IMAXYZ)»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения общего кортизола в сыворотке крови человека «Кортизол-Имаксиз (IMAXYZ)» предназначен для количественного *in vitro* определения концентрации общего кортизола в сыворотке крови человека.

1.2. Кортизол — глюкокортикоидный гормон, синтезируется в коре надпочечников под воздействием адренокортикотропного гормона (АКТГ). На его долю приходится около 90% всех циркулирующих в крови кортикоидов. В крови человека кортизол представлен двумя фракциями: связанной с белками крови (транскортином, альбумином) – 90%, и свободной, – 10%.

Этот гормон играет ключевую роль в защитных реакциях организма при стрессе, регулирует артериальное давление, обладает противовоспалительным эффектом. Кортизол опосредовано приводит к повышению концентрации глюкозы, влияет на содержание натрия и кальция, способствует усилению расщепления жиров и увеличению содержания холестерина.

Для кортизола характерен суточный ритм секреции: максимальная концентрация отмечается в утренние, а минимальная концентрация в вечерние часы.

Измерение уровня гормона используется для мониторинга функции надпочечников и как непрямой тест на гипер- или гипофункцию гипофиза, а также целостности связи гипоталамус-гипофиз-кора

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

надпочечников в рамках специальных тестов. Среди них – дексаметазоновый тест, тест стимуляции АКТГ и тест устойчивости к инсулину. Эти тесты позволяют провести дифференциальный диагноз болезни Кушинга (повышенный уровень кортизола) и синдрома Аддисона (пониженный уровень кортизола) и выяснить их природу.

Повышенные уровни кортизола могут быть ассоциированы с опухолями надпочечников и гипофиза или эктопическими АКТГ-продуцирующими опухолями.

Пониженные концентрации кортизола могут свидетельствовать о гипофункции надпочечников или нарушении его синтеза.

1.3. Набор «Кортизол-(IMAXYZ)» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора тетраметилбензидина (ТМБ) при использовании всех стрипов одновременно. Всего – 96 определений.

В случае дробного применения необходима обязательная постановка всех калибровочных проб для каждого отдельного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В наборе «Кортизол-Имаксиз (IMAXYZ)» использована технология количественного конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта на внутренней поверхности лунок микропланшетов иммобилизованы моноклональные антитела к кортизолу. При добавлении исследуемых образцов и конъюгата кортизол-пероксидаза происходит конкуренция между эндогенным кортизолом, содержащимся в исследуемых образцах, и конъюгатом кортизол-пероксидаза за связывание с моноклональными антителами до установления равновесия.

По окончании инкубации во время промывки происходит удаление всех несвязавшихся компонентов из зоны реакции.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках. Степень окраски обратно пропорциональна концентрации кортизола в анализируемых образцах.

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

Реакцию останавливают, добавляя стоп-реагент (при этом цвет раствора меняется с синего на желтый). Измеряют оптическую плотность раствора в лунках и проводят расчет концентрации кортизола в исследуемых образцах и контрольных материалах по калибровочному графику.

Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

3. СОСТАВ НАБОРА

МИКРОПЛАНШЕТ С МОНКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ К КОРТИЗОЛУ **1 упаковка**

Разборный полистирольный микропланшет со стрипами, разделяемыми на отдельные лунки, с иммобилизованными мышиными моноклональными антителами к кортизолу, маркирован «Микропланшет с моноклональными антителами к кортизолу».

КОНЪЮГАТ **1 флакон, 24 мл**

Конъюгат кортизола с пероксидазой, маркирован «Конъюгат».

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП) **комплект**

Лиофилизованные или жидкости.

ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» производит внутренние референсные стандарты с использованием кортизола (чистота по данным ВЭЖХ ≥98%). Калибровочные пробы изготавливаются гравиметрически и тестируются относительно этих внутренних референсных стандартов.

КП№1- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 0 нмоль/л кортизола, маркирован «Калибровочная проба №1».

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 20 нмоль/л кортизола, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 100 нмоль/л кортизола, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 250 нмоль/л кортизола, маркирован «Калибровочная проба №4».

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 800 нмоль/л кортизола, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 2000 нмоль/л кортизола, маркирован «Калибровочная проба №6».

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

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС) **1 флакон, 0,5 мл**

Лиофилизованная или жидкость.

Маркирован «Контрольная сыворотка», содержит известное количество кортизола, диапазон концентраций указан на этикетке флакона.

ПРИМЕЧАНИЕ: точные номиналы калибровочных проб и диапазон контрольной сыворотки указаны на этикетках флаконов и в паспорте к набору реагентов.

РАСТВОР ТМБ **1 флакон, 14 мл**

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ **1 флакон, 14 мл**

1М соляная кислота (HCl), маркирован «Стоп-реагент».

БУФЕР П **1 флакон, 20 мл**

Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (20-кратный концентрат), маркирован «Буфер П».

Принадлежности:

- пакет полиэтиленовый закрывающийся – **1 штука**;
- пленка для заклеивания микропланшета – **1 штука**.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация кортизола в сыворотке крови человека не превышает 7 нмоль/л.

4.2. Специфичность. Перекрестная реакции моноклональных антител к кортизолу с другими стероидам приведена в Таблице 1.

Таблица 1.

СТЕРОИД	*Перекрестная реактивность, %*
Кортизол	100
Кортикостерон	0,6
11-деоксикортизол	0,9
Преднизолон	5,6
17-гидроксипрогестерон	<0,1
Прогестерон	<0,1
Тестостерон	<0,1
Эстриол	<0,1
Эстрадиол	<0,1
Даназол	<0,1

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

4.3. Коэффициент вариации результатов определения кортизола в одном и том же образце с использованием набора «Кортизол-Имаксиз (IMAXYZ)» не превышает 8%.

4.4. Линейность. Зависимость концентрации кортизола в образцах сыворотки крови при разведении «Калибровочной пробой №1», имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90-110%.

4.5. Нормальные значения.

Нормальные значения в сыворотке крови составляют от 139 до 670 нмоль/л. При использовании набора рекомендуется уточнить концентрации кортизола, соответствующие нормальным, с учетом особенности популяции.

4.6. Аналитические характеристики метода исследования, используемого в наборе «Кортизол-Имаксиз (IMAXYZ)», (точность, чувствительность, воспроизводимость результатов измерения) установлены в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53022.2-2008.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Реагенты, входящие в состав набора, предназначены исключительно для лабораторной *in vitro* диагностики.

5.2. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.3. В учреждениях, в которых осуществляется работа с наборами реагентов, следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

5.4. Несмотря на то, что производные крови человека, входящие в состав наборов, были проверены на наличие антител к ВИЧ 1 и 2 типа, вирусу гепатита С, а также HBsAg и дали отрицательный результат, необходимо с калибраторами, контрольными материалами обращаться как с образцами, несущими инфекционную опасность, так как ни один существующий метод тестирования не может на 100% гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.5. При работе с исследуемыми образцами пациентов следует соблюдать меры предосторожности как в отношении инфекционно опасного материала. Настоятельно рекомендуется использование

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

одноразовых перчаток и других рекомендованных мер защиты (спецодежду), позволяющих снизить риск инфицирования.

5.6. Все материалы, контактировавшие с образцами крови пациентов, контрольными и калибровочными материалами должны быть инактивированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при 121°С, замачиванием в 5% растворе хлорамина Б в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом). Жидкие отходы, включая промывочные воды, должны быть инактивированы добавлением сухого хлорамина Б из расчета 50 г/л в течение 2 часов, либо обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом.

5.7. Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор соляной кислоты и обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

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

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

- Одно- или многоканальные дозаторы с изменяемым объемом отбора жидкостей в диапазонах 10 – 100 мкл, 50 – 300 мкл для постановки анализа и в диапазонах 100 – 1000 мкл, 1000 – 5000 мкл, 1000 – 10000 мкл для приготовления реагентов.
- Одноразовые сменные наконечники для дозаторов.
- Ванночки для реактивов для многоканального дозатора.
- Спектрофотометр, позволяющий производить измерение оптической плотности раствора в лунках при 450 нм.
- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.
- Фильтровальная бумага.
- Цилиндр мерный на 200 мл.
- Стакан стеклянный вместимостью 500 мл.

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

- Вода деионизованная или дистиллированная.
- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Взятие крови для анализа следует проводить с использованием стандартных процедур для венозной крови, а образцы сыворотки должны быть освобождены от клеток крови центрифугированием. После центрифугирования сыворотка крови должна быть перенесена в отдельную пробирку.

7.2. Следует избегать использования в анализе плазмы крови, гемолизованной, мутной или гиперлипемичной сыворотки.

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азида натрия.

7.4. Образцы сыворотки крови следует использовать в течение 24 часов с момента получения при условии их хранения при +2...8°C. Если тестирование откладывается более, чем на 24 часа, сыворотку следует отделить от сгустка и хранить при +2...8°C не более 5 суток. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре ниже -20°C. Избегать повторного замораживания образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

8.2. Микропланшет. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут во избежание конденсации влаги на поверхности лунок. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов или лунок. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

8.3. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка

Перед вскрытием флаконов ***с лиофилизованными калибровочными пробами*** и контрольной сывороткой стряхнуть частицы лиофилизованного порошка, прилипшие к стенкам флаконов и крышкам. Аккуратно открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон внести по 0,5

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

мл деионизованной воды, закрыть флаконы крышками и выдержать в течение 20 минут при комнатной температуре (18°C...25°C). Перемешать содержимое флаконов, аккуратно наклоняя и вращая их, избегая пенообразования.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

8.4. Буфер П. Необходимое количество промывочного буфера развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

10 мл Буфера П + 190 мл деионизованной или дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Готовый к использованию Буфер П хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным 20-кратный Буфер П хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

8.5. Конъюгат кортизол-пероксидаза готов к использованию.

8.6. Раствор ТМБ готов к использованию.

8.7. Стоп-реагент готов к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТМБ	ТМБ	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	КП1	КП1	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	КП2	КП2	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	КП3	КП3	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	КП4	КП4	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	КП5	КП5	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	КП6	КП6	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	КС	КС	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

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

9.2. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах. *Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут во избежание получения неправильных результатов исследования.*

9.3. Во все лунки, кроме А1 и А2, внести по 200 мкл конъюгата кортизол-пероксидаза.

9.4. Аккуратно перемешать содержимое лунок постукиванием по краю планшета в течение 1-2 минут.

9.5. Заклеить планшет специальной пленкой, входящей в состав набора.

9.6. Инкубировать стрипы в течение 60 минут при комнатной температуре (+18...25°С) без встряхивания.

9.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в специальную емкость для сбора инфицированного материала и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл Буфера П, приготовленного по п. 8.4, с последующим удалением жидкости в емкость для инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге до исчезновения следов наличия жидкости в лунках стрипов.

9.8. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°С) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

9.9. Остановить ферментную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента. Цвет реакционной смеси в лунках должен измениться с синего на желтый. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 минут.

Схема проведения анализа приведена на **Рисунке 1**.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

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

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

10.2. Определить среднее значение ОП в лунках А1 и А2 (контроль ТМБ) и вычесть его из среднего значения ОП калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

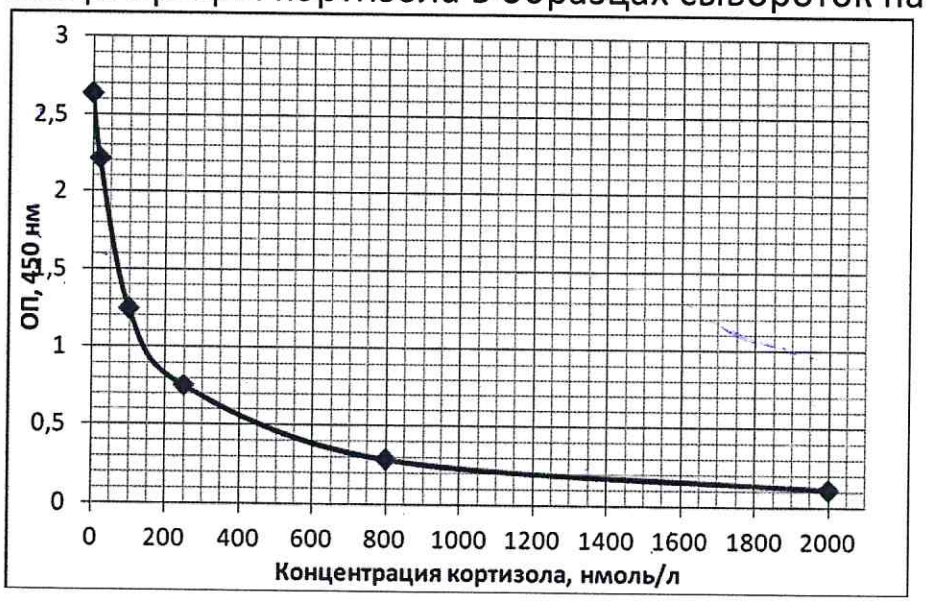
11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках А1 и А2 не превышает 0,1 ед.ОП.

11.2. В линейных координатах построить график зависимости оптических плотностей (ед.опт.плотн.) от концентрации кортизола в калибровочных пробах (нмоль/л), используя средние значения ОП дубликатов.

11.3. При наличии автоматической программы расчета на фотометре в качестве метода аппроксимации калибровочной кривой выбрать метод 4PL, 5PL. Использование метода cubic spline **не рекомендуется**.

11.4. Определить содержание кортизола в исследуемых образцах и контрольной сыворотке по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов.

Ниже приведен типичный график зависимости ОП калибровочных проб от концентрации в них кортизола. Данный график приведен исключительно в целях иллюстрации и не может быть использован для расчета концентрации кортизола в образцах сывороток пациентов:



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

12. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА.

12.1. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что количество независимых экспериментов ограничено объемом калибровочных проб.

12.2. Для каждого независимого эксперимента настоятельно рекомендуется построение нового калибровочного графика и определение концентрации аналита в контрольной сыворотке.

12.3. Не допускается использование реагентов разных серий при проведении анализа, а также использование ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера других фирм-производителей.

12.4. После окончания внесения реагентов необходимо плотно закрыть крышки флаконов и поместить их на хранение при температуре +2...8°С.

12.5. При интерпретации результатов исследования следует помнить, что уровень котизола может повыситься в результате приема некоторых лекарственных препаратов (например, пероральных контрацептивов, верошпирона, эстрогена и др.). Понижение концентрации кортизола вызывает дексаметазон, метирапон, леводопа, этакриновая кислота.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

13.1. Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения общего кортизола в сыворотке крови человека «Кортизол-Имаксиз (IMAXYZ)» должен храниться и транспортироваться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение и транспортировка набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Габаритные размеры набора - 165×130×100 мм, вес нетто – 200 гр, вес брутто – 300 гр.

Срок годности набора — 18 месяцев. Не допускается использование набора после истечения срока годности.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо после вскрытия хранить следующим образом:

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

- Микропланшет со стрипами хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;
- Конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°С;
- Калибровочные пробы и контрольную сыворотку после восстановления или вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°С;
- Буфер П и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;
- Буфер П, готовый к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°С). Не добавлять в емкость с используемым Буфером П вновь приготовленный раствор.

13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции. Любые отклонения от рекомендованных процедур проведения анализа и приготовления реагентов могут привести к получению неверных результатов исследования.

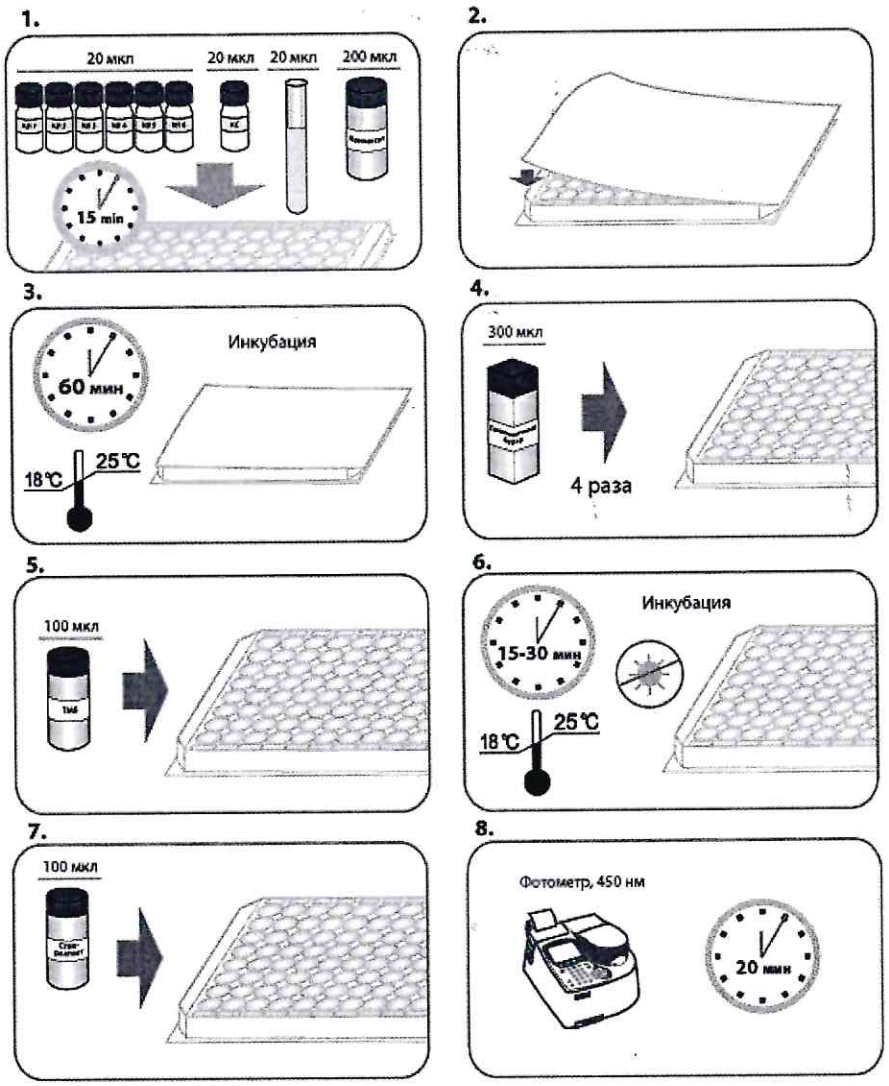
14. СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ И ДЕЗИНФЕКЦИИ.

Согласно классификации по СанПиН 2.1.7.2790-10 компоненты набора могут быть отнесены к классу «Г». Утилизация использованных реагентов и реагентов с истекшим сроком годности производить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 в отношении отходов класса «Г».
Дезинфекцию следует проводить в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Рисунок 1.



По вопросам качества набора обращаться в ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194356, Россия, г. Санкт-Петербург, Дорога в Каменку, д. 56, лит. А, тел./факс (812)326-61-98.

Генеральный директор
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» Е.Н.Схолль-Энгбертс.

Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» П.К.Варнавичус

15 ФЕВ 2017

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

Прошито, пронумеровано,
и скреплено печатью

Всего 13 листа(ов)

Ген. директор Сколль-Энгберте Е.Н.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 13 ЛИСТОВ
15 ФЕВ 2017
«__» _____ 201__ год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Т.К.

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