

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации кортизола в сыворотке крови
(КОРТИЗОЛ-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Кортизол – стероидный гормон с молекулярным весом 362 Да, синтезируемый корой надпочечников.

1.3. Количественное определение уровня кортизола в крови имеет диагностическое значение при оценке функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Особую важность определение кортизола имеет при таких заболеваниях, как болезнь Аддисона и болезнь Иценко-Кушинга.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. Директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной и м.н.с. С.В. Шеметовым.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуоферментном 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 пробах. 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) с иммобилизованными моноклональными антителами к кортизолу, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по «Lymphochek Immunoassay Plus Control Bio-Rad Cortisol»; содержащие известные количества кортизола – 0; 50; 150; 300; 600 и 1200 нмоль/л; концентрации кортизола в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,5 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола, готовая для использования – 1 флакон (0,5 мл);
- конъюгат кортизола с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- плёнка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночка для реагента – 2 шт.;
- наконечники для пипетки на 5-200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

СТЕРОИД	Перекрестная реакция, %
Кортизол	100
Преднизолон	28,0
11-Дезоксикортизол	2
Кортикостерон	0,03
Прогестерон	0,05
Эстрадиол	0,03
17- α -гидроксиprogестерон	0,4

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания кортизола в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора КОРТИЗОЛ-ИФА-БЕСТ не превышает 8 %.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации кортизола в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей кортизола, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 50-1200 нмоль/л и 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 контрольной сыворотки и калибровочной пробы 150 нмоль/л. Процент «открытия» составляет 90-110 %.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация кортизола не превышает 5 нмоль/л.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация кортизола, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 110 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет, находилась в диапазоне 160 – 670 нмоль/л.

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

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. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных 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 набором.

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

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $+37 \pm 1$ °С и 400-800 об/мин;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

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

– пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, с изменяемым объёмом отбора жидкостей на: 5 – 50 мкл, 50 – 350 мкл;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– колба вместимостью 1000 мл;

- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре +2–8°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре (+18-25 °C).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре +2–8 °C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Готовится в мерном цилиндре.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество 25-кратного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре +30-40 °C до полного растворения осадка.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре +2-8 °C не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных проб и контрольной сыворотки

Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть.

Калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

7.5. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

Допускается наличие небольшого осадка. Перед использованием встряхнуть.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в ванночку для реагента за 5-10 мин до начала постановки анализа.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор тетраметилбензидина плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора тетраметилбензидина плюс отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента за 5-10 мин до окончания инкубации и поместить в защищенное от света место.

Раствор тетраметилбензидина плюс после вскрытия флаконов хранить при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

Необходимо исключить воздействие света на раствор тетраметилбензидина плюс.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл каждой калибровочной пробы и по 10 мкл контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 10 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

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

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

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

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

Таблица

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор тетраметилбензидина плюс, мл.
	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	96	2,0	2,0
3	6,0	144	3,0	3,0
4	8,0	192	4,0	4,0
5	10	240	5,0	5,0
6	12	288	6,0	6,0
7	14	336	7,0	7,0
8	16	384	8,0	8,0
9	18	432	9,0	9,0
10	20	480	10	10
11	22	528	11	11
12	24	576	12	12

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.3), с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 5 раз. После каждой промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс (см п. 7.7).

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

Остатки раствора тетраметилбензидина плюс из флакона или ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором тетраметилбензидина плюс).

7.12. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в темноте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре $+37\pm 1$ °C и 650 об/мин.

7.13. 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 жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху).

Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 20 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации кортизола в калибровочных пробах (нмоль/л).

9.2. Определить содержание кортизола в контрольной сыворотке и в анализируемых пробах по калибровочному графику.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов КОРТИЗОЛ-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (9 мес). Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано в течение 1 месяца, но в пределах срока годности набора.

В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре +2–8 °С в течение всего срока годности;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2–8 °С в течение всего срока годности;

– раствор тетраметилбензидина плюс после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2–8 °С не более 1 мес;

– калибровочные пробы, контрольную сыворотку и конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2–8 °С не более 1 мес;

– промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8 °С не более 5 сут;

– построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации кортизола в контрольной сыворотке.

10.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре +2-8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

10.4. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

По вопросам, касающимся качества набора КОРТИЗОЛ-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, ЗАО «Вектор-Бест», тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383) 336-60-30, 332-67-52,

и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (499) 120-60-95; 120-60-96.

Зам. директора НИИ СД

ЗАО «Вектор-Бест»


М.Ю. Рукавишников

Зав. лабораторией

ЗАО «Вектор-Бест»


Н.Н. Сорокина

Младший научный сотрудник

ЗАО «Вектор-Бест»


С.В. Шеметов

Ректор СГМУ им. В.И. Разумовского

Росздрава


В.М. Попков



Информация получена с официального сайта
Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения
www.goszdrnadzor.ru



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
_____ листов

[Handwritten signature]