

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального директора
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»

О.Н. Шлюндин

«01» *декабря* 2014 г.

И Н С Т Р У К Ц И Я

по применению набора реагентов

«ДС-ИФА-Стероид-Кортизол»

Тест-система иммуноферментная для количественного
определения кортизола

Содержание

I. Назначение.....	3
II. Принцип теста.....	3
III. Состав набора «ДС-ИФА-Стероид-Кортизол».....	3
IV. Аналитические и диагностические характеристики набора.....	4
V. Меры предосторожности.....	5
VI. Инструкции по безопасности.....	6
VII. Утилизация и уничтожение.....	6
VIII. Необходимые материалы и оборудование, не поставляемые с набором реагентов.....	7
IX. Отбор и подготовка образцов.....	7
X. Подготовка реагентов.....	7
XI. Проведение анализа.....	8
XII. Учет результатов.....	8
XIII. Ограничения теста.....	9
XIV. Срок годности. Условия хранения и транспортирования.....	9
XV. Объяснение символов.....	9
XVI. Список литературы.....	9
Приложение 1.....	10
Приложение 2.....	11
Приложение 3.....	12

НАЗНАЧЕНИЕ

1. Набор реагентов «ДС–ИФА–Стероид–Кортизол» предназначен для количественного определения содержания кортизола в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

2. Кортизол – стероидный гормон с молекулярной массой 362 Да, является основным гормоном коры надпочечников. В крови кортизол циркулирует в основном в связанной с транскортином форме. Секреция кортизола подчиняется суточному ритму – максимальная концентрация кортизола в 6 – 9 ч утра, минимальная – в 22 – 24 ч. Количественное определение уровня кортизола в крови имеет диагностическое значение при оценке функционирования системы гипоталамус – гипофиз – кора надпочечников. Определение уровня секреции кортизола является важным при диагностике болезней Аддисона, Иценко-Кушинга.

3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 39-40 неизвестных проб, одной-двух проб контрольных сывороток, шести стандартных калибровочных проб и одной пробы для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора при одновременном использовании всех стрипов планшета (всего 96 определений).

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех калибровочных проб при каждой постановке.

II. ПРИНЦИП ТЕСТА

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца и конъюгата кортизол-пероксидаза, во время инкубации происходит конкурентное связывание сывороточного кортизола и кортизола, конъюгированного с пероксидазой, с моноклональными антителами к кортизолу, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета.

При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами конъюгата кортизол-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально концентрации кортизола в анализируемом образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата кортизол-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация кортизола в исследуемых образцах.

III. СОСТАВ НАБОРА «ДС-ИФА-Стероид-Кортизол»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к кортизолу.	1 шт.
Конъюгат - кортизол, меченный пероксидазой хрена. Прозрачная или опалесцирующая жидкость розового цвета. В качестве консервантов содержит: 0,1% ProClin 300, 0,004% гентамицина сульфат.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 – калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества кортизола. Прозрачные или опалесцирующие жидкости светло-желтого цвета. Значения концентраций кортизола в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консерванта содержат 0,1% ProClin 300.	6 флаконов по 0,5 мл

КС1 - контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола. Прозрачная или опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета. В качестве консерванта содержит 0,1% ProClin 300.	1 флакон 0,5 мл
КС2* - контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола. Прозрачная или опалесцирующая жидкость светло-желтого цвета. В качестве консерванта содержит 0,1% ProClin 300.	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат х 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор - прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 12,0 мл или 1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент/0,2М - серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл

* КС2 – контрольная сыворотка с известным содержанием кортизола поставляется по заявке потребителя.

Набор комплектуется готовыми реагентами или концентрированными растворами. Имеется цветовая кодировка реагентов, а также маркировка посредством штрих-кодов. Возможна комплектация увеличенными объемами реагентов или увеличенным количеством реагентов в стандартных дозировках.

Реагенты помещают в коробку картонную, куда вкладывают инструкцию по применению и бланк для построения калибровочной кривой.

Дополнительно набор может быть укомплектован	Крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов	1 шт. 2 шт.
	Одноразовые наконечники	16 шт.
	Пластиковая ванночка для жидких реагентов	2 шт.
	Пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком Zip-Lock	1 шт.

IV. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация кортизола в сыворотке крови человека не превышает 5 нмоль/л.

2. Специфичность. Величины перекрестных реакций с родственными соединениями приведены в таблице 2.

Таблица 2

Кросс-реагент	Кросс-реактивность, %
кортизол	100
кортизон	0,47
кортикостерон	10,7
тестостерон	0,27
эстрадиол	<0,001
эстриол	<0,001
прогестерон	4,6
андростендион	0,1

3. Коэффициент вариации результатов определения кортизола в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора не превышает 8%.

4. Линейность. Зависимость концентрации кортизола имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1-№5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» кортизола - соответствие измеренной концентрации кортизола предписанной в пробе, полученной смешением равных объемов контрольной сыворотки КС1 и «Калибратора 2». Процент открытия составляет 90 – 110%.

6. Клиническая проверка. Концентрацию кортизола измеряли в сыворотке крови, взятой у 95 здоровых людей в возрасте от 21 до 40 лет. Средняя концентрация кортизола в сыворотке крови, отобранной с 9 до 12 часов, составила 414 нмоль/л (138 – 690 нмоль/л). Средняя концентрация кортизола в сыворотке крови, отобранной после 12 часов, составила 207 нмоль/л (69 - 345 нмоль/л).

Правила перерасчета результатов:

$$\text{нмоль/л} \times 0,362 = \text{нг/мл}; \text{нг/мл} \times 2,76 = \text{нмоль/л}$$

7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций кортизола, соответствующие нормальным значениям для обследуемого контингента лиц.

V. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ Министерства здравоохранения РФ № 4Н от 06 июня 2012 г.).

5.2. Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

- Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой (18-25) °С
- Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:
 - неспецифического компонента (ПР(х 25)), который взаимозаменяем во всех тест-системах производства ООО «НПО «Диагностические системы»;
 - стоп-реагента, который может быть взаимозаменяемым в зависимости от молярности раствора.
 - ТМБ-Субстратного раствора, который взаимозаменяем во всех наборах для исследования гормонов и онкомаркеров, производства ООО «НПО «Диагностические системы»
- Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.
- Перед использованием все реагенты набора выдержать при температуре от 18 до 25 °С в течение 30 мин.
- Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.
- Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгатов.
- Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.
- Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.
- Перед использованием пластиковые ванночки для жидких реагентов ополоснуть водой дистиллированной или деионизированной. Посуду для работы с ТМБ-Субстратным раствором (ванночки, флаконы и т.д.) в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть водой дистиллированной или деионизированной, затем 70% раствором этилового спирта и ополоснуть водой дистиллированной или деионизированной.
- Ферментативная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгатов или ТМБ-Субстратного раствора.
- Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.

- Промывка лунок - важный этап проведения анализа: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются раствором. Не следует допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.
- Необходимо использовать только валидированные дозаторы и оборудование.
- Нельзя изменять процедуру проведения анализа.
- Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

VI. ИНСТРУКЦИИ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.
- Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении калибраторов и контрольных сывороток, не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ-1,2, антиген вируса гепатита В (HBsAg), p24 ВИЧ-1 и антитела к возбудителю сифилиса.
- В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.
- Нельзя пипетировать ртом.
- При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.
- При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами и реагентами, необходимо обращаться как с инфекционными материалами.
- При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.
- Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезактивировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.
- Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реагента с кожей и слизистыми.
- После проведения ферментативной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы, пробы и реагенты, любые жидкости, содержащие биологические образцы, до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кг/см² (0,15 МПа). Допустимо обеззараживание твердых отходов способом погружения в 3% раствор хлорамина Б (длительность дезинфекции не менее 1 часа) или другого разрешенного к промышленному выпуску и применению в РФ дезинфицирующего средства. Жидкие отходы (промывочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или другого хлорсодержащего средства. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.



- ^{х1} Некоторые реагенты содержат 0,1% ProClin 300. ProClin 300 0,1% - раздражающее вещество. Может вызвать сенсibilизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

VII. УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

При утилизации и уничтожении все реагенты и материалы, являющиеся отходами, должны быть обработаны в соответствии с действующими нормативами (СанПиН 2.1.7.2790-10, СП 1.3.2322-08, МУ-287-113).

III. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- Термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание планшета при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ со скоростью от 500 до 800 об/мин;
- Устройство для промывания планшетов (вошер);
- Дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- Дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- Цилиндры мерные вместимостью 200 мл и 500 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл;
- Вода дистиллированная или деионизированная;
- Бумага фильтровальная лабораторная;
- Перчатки резиновые или пластиковые.

IX. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Недопустимо использование образцов сыворотки крови с добавлением азида натрия или тимеросала в качестве консерванта!** Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы сыворотки крови можно хранить при температуре $2 - 8^\circ\text{C}$ не более 3 суток или при температуре минус 20°C и ниже не более 3 месяцев (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). **Образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией анализировать нельзя!** Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 минут при температуре $2 - 8^\circ\text{C}$.

X. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Реагенты, готовые к применению:

- **Иммуносорбент.** Во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут! Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку. Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать. Для этого поместить вскрытый пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком Zip-Lock или край фольгированного пакета свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета.
- **Стандартные калибровочные пробы.**
- **Конъюгат.**
- **Контрольные сыворотки.**
- **ТМБ-Субстратный раствор.**
- **Стоп-реагент.**

2. Реагенты, требующие предварительного приготовления

- **Рабочий промывочный раствор (ПР).** Содержимое флакона с концентратом (х 25) промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной или деионизированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл воды). Полученный раствор тщательно перемешать. Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут при комнатной температуре или 28 сут при температуре от 2 до 8°C .

Хранение неиспользованных реагентов

После вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты набора: стандартные калибровочные пробы, контрольные сыворотки, конъюгат, ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении 12 месяцев при температуре от 2 до 8 °С. Оставшиеся неиспользованными ПР (концентрат х 25), стоп-реагент хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С, при условии соблюдения герметизации.

XI. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: Перед использованием все реагенты набора выдержать в течение 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

1. Стандартные калибровочные пробы и контрольные сыворотки вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора. Остальные лунки внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови в двух повторах.

Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 минут!

2. Во все лунки планшета, кроме лунок с контролем ТМБ-Субстратного раствора, внести по 100 мкл конъюгата, планшет закрыть крышкой или защитной пленкой.

3. Возможны две процедуры инкубации планшета:

Процедура 1 (термостатируемый шейкер, $(37,0 \pm 0,5)$ °С):

Планшет инкубировать в течение 30 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью от 500 до 800 об/мин при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С.

Процедура 2 (комнатная температура):

После внесения в лунки планшета образцов и конъюгата содержимое перемешать аккуратным постукиванием по краям планшета в течение 30 секунд, стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать в течение 60 минут при комнатной температуре $(18-25)$ °С.

4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала, планшет промыть 5 раз рабочим ПР, добавляя во все лунки планшета не менее 300 мкл рабочего ПР и удаляя рабочий ПР с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала. После последнего промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки о стрипы в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

5. Немедленно внести во все лунки планшета по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдержать при комнатной температуре в темноте:

Процедура 1: 20-30 мин.

Процедура 2: 20-30 мин.

6. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

Схема проведения ИФА приведена в Приложении 2.

7. **Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при установке тест-системы «ДС-ИФА-Стероид-Кортизол» на автоматических ИФА-анализаторах.** Контроль внесения конъюгата рекомендуется проводить при длинах волн 540 (550) нм, критерий: ОП > 0,500.

XII. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Для обсчета результатов также возможно использовать построенный в системе координат "Logit-Log" график зависимости Logit (B/B_0) от логарифма (LN) концентрации

кортизола в калибровочных пробах, где В – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В0 – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу 0. Logit (В/В0) рассчитывается как $\ln((1-B/B_0)/(B/B_0))$.

Определение концентрации кортизола в контрольных сыворотках необходимо для проверки точности и достоверности полученных результатов. В том случае, когда полученное значение концентрации в контрольной сыворотке находится в пределах концентраций, указанных на этикетке флакона с контрольной сывороткой, полученные при анализе исследуемых проб результаты являются достоверными.

III. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

- 1. Содержание кортизола в сыворотке может зависеть от времени взятия образца или назначения преднизолона, преднизона и других структурно-связанных кортикостероидов.
- 2. Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах данного теста. В диагностических целях результаты должны обязательно использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тестами.

IV. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 18 месяцев. Срок годности указан на упаковке набора. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.
Хранение – в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.
Транспортирование - при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование и хранение при температуре от 9 до 25 °С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять по адресу предприятия-изготовителя – ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12. E-mail: info@npods.nnov.ru, www.npods.ru.

V. ОБЪЯСНЕНИЕ СИМВОЛОВ

	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)		Температурные пределы хранения
	Производитель		Срок годности число/месяц/год
	Каталожный номер		Использовать инструкцию по применению
	Количество определений		Содержит раздражающее вещество
	Номер партии (серии)	Code: X.X.XX	Идентификационный код
	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)		

VI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Приложение 1 к данной инструкции.

Директор по производству
ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы»

В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО
Зав.кафедрой клинической лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России
И.М.В. профессор

В. В. Долгов

24 ДЕК 2014



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peters J.R., et al., Clin Edocrinol. 17:583, 1982.
2. Papanicolaou, D.A. et al J. Cli Endocrinol Metab 87(10)4515-4521.
3. Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

Методы математической обработки результатов

При учете результатов с помощью встроенного или внешнего программного обеспечения спектрофотометра рекомендуется использовать следующие методы математической обработки результатов:

Марка спектрофотометра	Рекомендуемые методы математической обработки
Statfax 2100, 3200	Linear regression в координатах Logit-Log
Tecan Sunrise	4 parameter Marquardt
Bio-Rad 680	4 PL-Cook-Wilkenson
Multiscan EX	Не рекомендуется автоматический расчет концентраций на ридере
Multiscan FC	4 parameters logistic