



Унитарное предприятие
«Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси»
Республика Беларусь
220141, г. Минск, ул. Академика Купревича В.Ф., 5, корп.3
Факс (017) 263-62-57

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРТИЗОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-КОРТИЗОЛ

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1. Набор "ИФА-Кортизол" предназначен для количественного определения кортизола в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Количественное определение уровня кортизола в крови необходимо для диагностики нарушений в системе гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1. Состав набора:

№	Название компонента	Количество
1	Иммуносорбент (96-луночный стриповый планшет с иммобилизованными моноклональными антителами к кортизолу)	1 шт.
2	КРП (Концентрат раствора для промывания планшета)	1 фл. 20 мл
3	СБР (Субстратный буферный раствор)	1 фл., 13 мл
4	Конъюгат	1 фл. 12 мл
5	Раствор ТМБ (3,3',5,5'-тетраметил-бензидин)	1 фл., 1,0 мл
6	Калибровочные пробы (0-2000 нмоль/л)	6 мкпр. по 0,5 мл
7	Контрольная сыворотка	1 мкпр., 0,5 мл
8	Стоп-реагент	1 фл., 13 мл

2.2. Набор ИФА-Кортизол рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной, одной контрольной и 6 калибровочных проб – всего 96 определений. Количество реагентов рассчитано на 3 постановки по 4 стрипа.

Принцип работы набора состоит в следующем.

В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным кортизолом сыворотки крови с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности крови с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами кортизола и конъюгата.

Во время инкубации с хромоген-субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Пероксидазную реакцию останавливают путем добавления стоп-реагента, содержащего 0,5 М серную кислоту. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как в величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Величина ОП обратно пропорциональна количеству кортизола в образце сыворотки крови. На основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация кортизола в определяемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

3.2. Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1] и [2]. В случае пролива сыворотки крови на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [3].

3.3. При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4. Соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент содержит серную кислоту. При попадании на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

4.1. Спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета или стрипа при 450 нм;
-полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
-суховоздушный термостат типа ТС-80 М2 или аналогичный ему;
-вихревой смеситель;
-пипетки 8-канальные полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 мл,
-пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 до 5,0 мл;
-стаканы лабораторные стеклянные вместимостью 200-1000 мл;
-флаконы вместимостью 10 и 20 мл;
-ванночки для реагентов вместимостью 60 мл или чашки Петри;
-клеякая лента или крышка;
-вода дистиллированная.

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

5.1. За 30 мин. до проведения анализа компоненты набора и анализируемые образцы сыворотки крови должны быть перенесены из холодильника в помещение с температурой (18-22° С).

5.2. Подготовка стрипов

Перед началом работы освободить необходимое количество стрипов от упаковочного пакета, вставить их в рамку. Стрипы, которые не используются в данной постановке, можно хранить в плотно закрытом пакете без доступа влаги при температуре (2-8)°С в течение трех месяцев.

5.3. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

После вскрытия микропробирок растворы можно хранить при температуре (2-8)°С не более 1 месяца. При температуре не менее минус 20°С - в течение всего срока годности набора. Допускается однократное замораживание и размораживание растворов.

Перед работой микропробирки с калибровочными пробами и КС интенсивно встряхнуть, избегая образования пены.

5.4. Приготовление раствора для промывания

Содержимое флакона концентрата раствора для промывания планшета интенсивно встряхнуть, отобрать в мерный стакан необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), добавить дистиллированной воды до нужного объема и перемешать раствор.

Раствор можно хранить при температуре (2-8)°С не более 3 суток.

5.5. Приготовление хромоген-субстратного раствора.

В чистый флакон отобрать определенный объем СБР, заданный количеством используемых стрипов (таблица 1), и необходимый объем раствора ТМБ, тщательно перемешать.

ВНИМАНИЕ! Хромоген-субстратный раствор готовят непосредственно перед использованием! Раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветным.

Таблица 1

Количество используемых стрипов	Раствор для промывания планшета		Хромоген-субстратный раствор	
	КРП, мл	Дистиллированная вода, до мл	Раствор ТМБ, мл	СБР, мл
4	5	200	0,2	4
8	10	400	0,4	8
12	20	800	0,6	12

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом: N1 - B₀, N2 - B₁, N3 - B₂, N4 - B₃, N5 - B₄, N6 - B₅, N7-BK_c, N_x - неизвестные образцы.

6.2. Отобрать из каждой микропробирки с калибровочными пробами, КС или неизвестными образцами по 0,025 мл раствора и внести в соответствующие лунки.

6.3. Во все промаркированные лунки, внести по 0,1 мл раствора конъюгата. Перемешать содержимое лунок 5-6 круговыми движениями по поверхности стола.

6.4. Планшет заклеить пленкой и инкубировать 1 час в термостате при температуре 37°С.

6.5. Удалить содержимое лунок. Все лунки промыть 4 раза промывочным раствором (по 0,3 мл в лунку). Удалить остатки жидкости.

6.6. Во все лунки внести по 0,1 мл хромоген-субстратного раствора, приготовленного по п. 5.5. и инкубировать при

температуре (18-25) °С в темноте в течение 15-25 мин, в зависимости от степени развития окраски.

6.7. Остановить реакцию добавлением во все лунки по 0,1 мл стоп-реагента, встряхнуть планшет или стрип. Измерить на спектрофотометре оптическую плотность раствора во всех лунках при 450 нм не позже чем через 15 мин после остановки реакции.

7. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

7.1. Рассчитать средние арифметические значения ОП (Vi), в ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыворотку – КС, исследуемые образцы сыворотки крови – Xi.

7.2. Построить калибровочную кривую в полулогарифмических координатах, откладывая по оси ординат значения ОП (в ОЕ), а по оси абсцисс – значения концентраций кортизола (нмоль/л) в соответствующих калибровочных пробах.

7.3. Определить по калибровочному графику содержание кортизола в КС. Содержание кортизола в КС должно соответствовать указанному на этикетке значению.

7.4. По калибровочному графику определить содержание кортизола в исследуемых образцах сыворотки крови человека.

8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1. Специфичность. Перекрестная реакция антител к кортизолу с другими стероидами приведена в таблице 2.

Таблица 2.

Стероид	Перекрестная реакция, %	Стероид	Перекрестная реакция, %
Кортизол	100	Прогестерон	0,07
11-дезоксикортизол	0,9	Тестостерон	0,08
Кортикостерон	0,6	Эстрадиол	0,07
Дезоксикортикостерон	0,06	Эстриол	0,07
Преднизолон	5,2	Даназол	0,005

8.2. Чувствительность. Минимальная концентрация кортизола, достоверно определяемая с помощью набора, составляет не более 10 нмоль/л.

8.3. Воспроизводимость результатов. Коэффициент вариации результатов 10 определений концентрации кортизола в образцах сыворотки крови с использованием набора не превышает 10%.

8.4. Тест на «открытие». Процент «открытия» кортизола, добавленного в образцы сыворотки крови с известной концентрацией кортизола, составляет (80-120)%.

8.5. Клиническая проверка набора. Содержание кортизола в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у здоровых доноров, составляет: (250-670) нмоль/л.

8.6. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора ИФА-Кортизол уточнить значения концентраций кортизола, соответствующие нормальным.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Набор реагентов ИФА-Кортизол должен храниться в сухом помещении при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности. После вскрытия флаконов с конъюгатом, КРП, СБР, раствором ТМБ и стоп-реагентом растворы можно хранить при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности.

9.2. Не допускается смешивание компонентов наборов разных серий. Во время проведения анализа следует избегать подсыхания лунок на всех этапах постановки анализа и попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

9.3. Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сывороток, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования. Образцы сывороток хранят при температуре (2-8)°С не более 72 ч после взятия пробы. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры не менее минус 20 °С) не более одного раза. Каждый образец сыворотки, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.

Необходимо помнить, что образцы с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившиеся без замораживания и содержащие азид натрия не пригодны для анализа.

9.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора и квалифицированное проведение анализа.

9.5. Срок годности набора 6 месяцев с даты изготовления.