

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Руководитель Департамента  
государственного контроля качества,  
эффективности, безопасности лекарственных  
средств и медицинской техники МЗ РФ

\_\_\_\_\_ Р.У. Хабриев

«8» ноября 2000 г.

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

**(СтероидИФА-кортизол-01)**

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа Комитета  
по новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 8 от 18 сентября 2000 г.)

ВЗАМЕН ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ,  
УТВЕРЖДЕННОЙ 30 июля 1995 г.

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «СтероидИФА-кортизол-01» предназначен для количественного определения концентрации кортизола в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Кортизол — стероидный гормон с молекулярной массой 362Да. Количественное определение уровня кортизола в крови имеет диагностическое значение при оценке функционирования системы гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников. Особую важность определение кортизола имеет при таких заболеваниях, как болезнь Аддисона и болезнь Иценко-Кушинга.

**1.3.** Набор «СтероидИФА-кортизол-01» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

**Примечание:** В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

## **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

Принцип работы набора состоит в следующем. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата кортизол-пероксидаза, во время инкубации устанавливается равновесие между конъюгатом и эндогенным кортизолом сыворотки крови за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами кортизола и конъюгата кортизол-пероксидаза, причем количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству кортизола в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с раствором ТМБ 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 определяемых образцах.

### 3. СОСТАВ НАБОРА

- комплект из двенадцати восьмилучных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к кортизолу, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к кортизолу» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества кортизола; значения концентраций кортизола в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат кортизол-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием кортизола, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл).

### 4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

**4.1. Специфичность.** Перекрестная реакция антител к кортизолу с другими стероидами приведена в таблице.

**4.2. Коэффициент вариации результатов определения кортизола в одном и том же образце с использованием набора «СтероидИФА-кортизол-01» не превышает 8%.**

**4.3. Линейность.** Зависимость концентрации кортизола в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей кортизол, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2–№ 6 и составляет  $\pm 10\%$ .

Таблица

| СТЕРОИД              | Перекрестная реакция, % |
|----------------------|-------------------------|
| Кортизол             | 100,0                   |
| Преднизолон          | 6,0                     |
| 11-Дезоксикортизол   | 0,9                     |
| Кортикостерон        | 0,6                     |
| Дезоксикортикостерон | <0,1                    |
| Прогестерон          | <0,1                    |
| Тестостерон          | <0,1                    |
| Эстрадиол            | <0,1                    |
| Эстриол              | <0,1                    |

**4.4. Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» кортизола — соответствие измеренной концентрации кортизола предписанной в пробе,

полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110.

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

**4.6.** Клиническая проверка. Содержание кортизола измеряли в сыворотке крови взятой с 9 до 11 часов у 40 здоровых лиц в возрасте 21–45 лет. Средняя концентрация кортизола составила 378 нмоль/л (150–660 нмоль/л).

**4.7.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций кортизола, соответствующие нормальным.

## **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**5.1.** Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

**5.2.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

**5.3.** 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).

**5.4.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

**5.5.** Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

**5.6.** Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

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

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

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл и на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 200 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 300 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

### **7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.**

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к пробкам. Открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5мл дистиллированной воды и закрыть пробки. Выдержать флаконы в течение 10минут при комнатной температуре (+18...25°C). Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

**7.2. Стрипы.** Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.3. Промывочныйбуфер.** Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10раз. Например:  
5мл БуфераР + 45мл дистиллированной воды.  
Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5суток. Оставшийся неиспользованным БуферР хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.4. Конъюгат кортизол-пероксидаза** готов к использованию.

**7.5. Раствор ТМБ** готов к использованию.

**7.6. Стоп-реагент** готов к использованию.

## **8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**8.1.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На последней странице приведена схема проведения анализа.

**8.2.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 — №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — №2 для калибровочной пробы №1;

C1, C2 — №3 для калибровочной пробы №2;

D1, D2 — №4 для калибровочной пробы №3;

E1, E2 — №5 для калибровочной пробы №4;

F1, F2 — №6 для калибровочной пробы №5;

G1, G2 — №7 для калибровочной пробы №6;

H1, H2 — № 8 для контрольной сыворотки.

**8.3.** Внести в соответствующие лунки по 50 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

**8.4.** Во все лунки, кроме A1 и A2, немедленно внести по 150 мкл конъюгата кортизол-пероксидаза.

**8.5.** Инкубировать стрипы при встряхивании в течение 1 часа в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

**8.6.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.3, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 сек. с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

**8.7.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

**8.8.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 мин.

**8.9.** Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для расчетов необходимо использовать формулу  $V/B_0 \times 100\%$  для каждой калибровочной или исследуемой пробы, где  $V$  — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,  $B_0$  — среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу 0 нмоль/л. В координатах «logit-log» построить для калибровочных проб график зависимости  $V/B_0 \times 100\%$  от концентрации кортизола в калибровочных пробах (нмоль/л).

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой  $(V - V_T) / (B_0 - V_T) \times 100\%$ , где  $V_T$  — среднее значение оптической плотности лунок A1 и A2.

Определить содержание кортизола в пробах по калибровочному графику.

**8.10.** Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение **20 минут** при температуре +2...8°C.

## **9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

**9.1.** Набор «СтероидИФА-кортизол-01» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат кортизол-пероксидаза и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5суток при комнатной температуре (+18...25°C);
- БуферР и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в течение всего срока годности при температуре +2...8°C.

**9.2.** Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

**9.3.** При вскрытии и растворении лиофилизированных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

**9.4.** При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации кортизола в контрольной сыворотке.

**9.5.** Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

**9.6.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

**По вопросам качества набора «СтероидИФА-кортизол-01» обращаться по адресу: 189650, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д.70/4, телефон/факс: (812) 596-76-80, или в ИГКЛС НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14 А, телефон (095) 120-60-95.**

## СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

| Стадия анализа<br>и реагенты              | Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п.8.2.  |     |     |     |     |     |     |     |      |
|---|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|   | 1  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9–48 |
| КП № 1, мкл                               | —  | 50  | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —    |
| КП № 2, мкл                               | —  | —   | 50  | —   | —   | —   | —   | —   | —    |
| КП № 3, мкл                               | —  | —   | —   | 50  | —   | —   | —   | —   | —    |
| КП № 4, мкл                               | —  | —   | —   | —   | 50  | —   | —   | —   | —    |
| КП № 5, мкл                               | —  | —   | —   | —   | —   | 50  | —   | —   | —    |
| КП № 6, мкл                               | —  | —   | —   | —   | —   | —   | 50  | —   | —    |
| КС, мкл                                   | —  | —   | —   | —   | —   | —   | —   | 50  | —    |
| С <sub>х</sub> , мкл<br>Конъюгат          | —  | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | 50   |
| кортизол-<br>пероксидаза, мкл             | —  | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150  |
| Инкубация № 1<br>4-кратная                | 1 час, термостатируемый шейкер, +37°C  |     |     |     |     |     |     |     |      |
| промывка:<br>промывочный<br>буфер, мкл    | 4х   | 4х  | 4х  | 4х  | 4х  | 4х  | 4х  | 4х  | 4х   |
| Раствор ТМБ,<br>мкл                       | 300  | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300  |
| Инкубация № 2<br>Стоп-реагент,<br>мкл     | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100  |
| Перемешивание                             | КТ, темное место, 15–30 мин.   |     |     |     |     |     |     |     |      |
| Измерение ОП<br>р-ров в лунках<br>стрипов | Шейкер, 1–2 мин.   |     |     |     |     |     |     |     |      |
| Расчет<br>результатов                     | Фотометр, 450 нм<br>Калькулятор и масштабная бумага<br>либо соответствующая компьютерная программа |     |     |     |     |     |     |     |      |

**Примечания:** КП — калибровочная проба;  
 КС — контрольная сыворотка;  
 С<sub>х</sub> — анализируемые пробы;  
 ОП — оптическая плотность;  
 КТ — комнатная температура (+18...25°C).

---

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Алкор Био»:  
 зав. лабораторией биотехнологии В.А. Головаченко  
 и ген. директором, к.б.н. Д.Г. Полынцевым