

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРТИКОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ

EIA-4164, Corticosterone ELISA

Каталог. № : EIA-4164
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 07-2012
Версия 7.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1 ВВЕДЕНИЕ

1.1 Назначение использования

Набор предназначен для количественного in Vitro определения Кортикостерона в сыворотке и плазме.

1.2 Резюме

Кортикостерон является глюкокортикоидным гормоном, секретлируемым корой надпочечников. Кортикостерон продуцируется в ответ на стимуляцию коры надпочечников адренокортикотропным гормоном (АКТГ) и является предшественником альдостерона. Кортикостерон оказался удобным для использования в качестве главного индикатора стресса, так как стресс увеличивает продукцию кортикостероидов.

Концентрация кортикостерона и степень стресса изучаются в экспериментах по нарушению воспроизведения долговременной памяти¹, уровень кортикостерона хронически повышается при лечебном голодании² и в ответ на ожоговое поражение³. Кроме участия в механизме стресса, кортикостерон, по-видимому, играет решающую роль в состояниях сон-бодрствования^{4,5}.

2 ПРИНЦИП МЕТОДА

Иммуноферментный метод в наборе **Corticosterone EIA** основан на принципе конкуренции с последующим разделением на твердой фазе микропланшета. Неизвестное количество кортикостерона, присутствующее в исследуемом образце, и фиксированное количество кортикостерона в пероксидазном конъюгате – конкурируют за места связывания кортикостерона в поликлональной сыворотке, сорбированной в лунках планшета. Через час инкубации планшет промывают для остановки конкурентной реакции и после добавления раствора субстрата измеряют оптическую плотность раствора в лунках. Рассчитанная концентрация кортикостерона обратно пропорциональна измеряемому величинам оптической плотности.

3 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

- Данный набор предназначен только для in vitro диагностики и профессионального использования.
- Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg and HCV по методам одобренным FDA. Однако, не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.
- Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
- Микротитровальная плашка содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °C - 8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
- Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.
- Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно во флаконы, так это может привести к контаминации реагентов.

- Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
- Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавьте реагенты сразу после промывки.
- Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26°C). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
- Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
- Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
- Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
- Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
- Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.
- Избегайте контакта со стоп раствором – 0.5M H₂SO₄; 1M HCL. Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
- Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
- Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на кожу и слизистые. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
- Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
- Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в DRG.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Материалы и реагенты, входящие в состав набора

4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки** 12 x 8 (делимые) полоски, 96 лунок; Лунки покрыты антителом анти-Кортикостерона (поликлональным).
2. **Стандарт (Стандарт 0-6)**, 7 флаконов, 1 мл, готовы к использованию; концентрации: 0-5-15-30-60-120-240 нмоль/л; конверсия: 1 нмоль/л = 34.646 нг/дл = 0.34646 нг/мл. Содержит консервант.
3. **Контроли Низкий и Высокий**, 2 флакона 1 мл каждый, готовы к использованию. Значения и диапазоны указаны на этикетках. Содержат консерванты.
4. **Ферментный конъюгат, 250X** Концентрат, 1 флакон, 150 мкл Кортикостерон, конъюгированный с пероксидазой хрена.
5. **Растворитель конъюгата**, 1 флакон, 25 мл, готов к использованию.
6. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 25 мл, готов к использованию. ТМБ.
7. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, содержит 0.5 M H₂SO₄. Избегать контакта со Стоп-раствором. Это может вызвать раздражения кожи и ожоги.
8. **Промывочный раствор**, 1 флакон, 30 мл (концентрация 40X) См. „Подготовка реагентов“.

Примечание: По отдельному запросу может быть поставлен дополнительный нулевой стандарт, используемый для разведения образцов.

4.2 Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

- Микротитровальный планшетный откалиброванный считыватель (450 нм +/- 10нм).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Промокательная бумага.
- Деионизированная или дистиллированная вода.
- Таймер.
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение.

4.3 Хранение и стабильность реагентов набора

Невыскранные реагенты сохраняют реакционную способность при хранении при температуре 2-8 °С в течение срока годности, указанного на этикетке. Не используйте компоненты набора по истечении срока годности.

Открытые реагенты должны храниться при 2-8°С. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°С. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным, чтобы его снова плотно закрыть.

4.4 Приготовление реагентов

Перед использованием дайте всем реагентам и стрипам (в количестве, необходимом для проведения анализа) прогреться до комнатной температуры.

Промывочный раствор

Разведите 30 мл концентрата промывочного раствора, добавив к нему 1170 мл дистиллированной воды, до конечного объема 1200 мл. *Разведенный промывочный раствор сохраняет стабильность в течение 2 недель при комнатной температуре.*

Ферментный Конъюгат

Развести концентрат Ферментного конъюгата 1 + 250 в *Разбавителе Конъюгата*.

Раствор должен быть свежеприготовленным.

Если используется весь планшет, развести 100 мкл Ферментного Конъюгата с 25 мл Растворителя.

Если весь планшет сразу не используется, подготовить только необходимое количество Ферментного Конъюгата.

4.5 Уничтожение набора

Удаление остатков набора должно производиться в соответствии с действующими местными правилами утилизации биологических отходов. Специальная информация дана в Material Safety Data Sheet для данного продукта (см. раздел 13).

4.6 Поврежденные наборы

В случае любого серьезного повреждения набора или его компонентов следует информировать компанию DRG в письменном виде, в течение недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты нельзя использовать для проведения анализа. Их следует сохранять до тех пор, пока не будет найден последний раствор. После этого компонент следует удалить в соответствии действующими местными правилами утилизации биологических отходов.

5 ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Сыворотка или ЭДТК плазма могут использоваться в данном анализе.

Не использовать гемолитические, иктерические или липемические образцы. Внимание: В данном тесте нельзя использовать образцы, содержащие азид натрия.

5.1 Сбор образцов

Сыворотка:

Возьмите кровь из вены и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать перед полным сворачиванием крови.

Плазма:

Собрать цельную кровь в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт, и центрифугировать немедленно.

5.2 Хранение образцов

Пробирки с образцами следует закрыть крышками, их можно хранить до проведения анализа в течение 24 часов при температуре 2-8 °С. Образцы, не использованные в день взятия, следует заморозить (только один раз) и хранить при температуре -20° С в течение длительного периода времени. После оттаивания и перед проведением анализа образец следует перемешать, несколько раз перевернув пробирку.

5.3 Разведение образцов

Если первый раз во время анализа в образце обнаружено количество Кортикостерона, превышающее концентрацию самого высокого стандарта, образец можно развести нулевым стандартом и исследовать вновь, как описано в разделе "Процедура анализа".

Для подсчета концентраций принять во внимание коэффициент разведения.

Например:

а) разведение 1:10: 10 мкл сыворотки + 90 мкл нулевого стандарта (тщательно перемешайте)

б) разведение 1:100: 10 мкл разведения а) 1:10 + 90 мкл нулевого стандарта (тщательно перемешайте).

6 ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1 Общие замечания

- Все компоненты набора и образцы перед использованием необходимо выдержать при комнатной температуре. Все реагенты необходимо перемешать, избегая образования пены.
- После начала исследования все этапы необходимо проводить без перерыва.
- Для предотвращения перекрестной контаминации реагентов при внесении всех реагентов, исследуемых образцов, стандартов и контролей используйте новые сменные наконечники к пипеткам.
- Величина измеряемой оптической плотности зависит от времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки с флаконов и пробирок, закрепить необходимое количество лунок в рамке планшета и т.д. Это обеспечит на каждой стадии равномерное, без перерывов, внесение реагентов в лунки.
- Энзиматическая реакция прямо пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Стандартная кривая должна строиться для каждого пробега.

1. Закрепите в рамке планшета необходимое количество лунок.
2. Внесите в соответствующие лунки, каждый раз используя новый одноразовый наконечник, по **20 мкл Стандарта, Контроля** и образцов.
3. Внесите в каждую лунку по **200 мкл Ферментного Конъюгата**.
4. Тщательно перемешайте содержимое лунок встряхиванием планшета в течение 10 секунд. На этой стадии важно достичь полного перемешивания.
5. Инкубируйте планшет в течение **60 минут** при комнатной температуре.
6. Энергично вытряхните из лунок их содержимое. Промойте лунки 3 раза разведенным концентратом промывочного раствора (400 мкл на лунку). Удалите остатки жидкости из лунок, резким постукиванием перевернутого планшета по влагопоглощающей бумаге.
Это важно: Чувствительность и точность данного анализа сильно зависят от правильности выполнения процедуры промывки!
7. Добавьте во все лунки (через равные промежутки времени) по **100 мкл Субстратного Раствора**.
8. Инкубируйте планшет в течение **15 минут** при комнатной температуре.
9. Остановите ферментативную реакцию, внося во все лунки (через такие же промежутки времени, как в п.7) по **50 мкл Стоп-Реагента**.
10. Не позднее, чем через **10 минут** после добавления *Стоп-Реагента*, измерьте с помощью планшетного спектрофотометра оптическую плотность раствора в лунках при длине волны **450±10 нм**.

6.3 Расчет результатов

1. Рассчитайте для каждого стандарта, контроля и исследуемого образца пациента среднюю величину оптической плотности.
2. На миллиметровой или полулогарифмической бумаге постройте калибровочную кривую зависимости средней оптической плотности стандартов (по вертикальной оси Y) от концентрации кортикостерона в стандартах в нмоль/л (по горизонтальной оси X).
3. Используя среднее значение оптической плотности для каждого исследуемого образца, интерполируйте это значение на калибровочную кривую и на оси X определите соответствующую концентрацию кортикостерона, умножая полученный результат, если это необходимо, на коэффициент разведения образца. В зависимости от опыта и возможностей компьютера, можно использовать также другие методы обработки данных.
4. Автоматический метод: для построения кривой мы рекомендуем применять компьютерную программу, использующую кубическую функцию, 4 PL (4-параметрическую логистику) или преобразование Logit-Log.
5. Концентрацию кортикостерона в образце можно прямо определять по стандартной кривой. Образцы, превышающие по концентрации самый высокий стандарт кортикостерона, следует развести далее или принять значения > 240 нмоль/л, повторить анализ и при расчете концентрации учесть фактор разведения.

6.3.1 Пример Типичной Стандартной кривой

Не использовать для расчета.

Стандарт	Оптические Единицы (450 нм)
Нулевой стандарт (0 нмоль/л)	2.31
Стандарт 1 (5 нмоль/л)	1.69
Стандарт 2 (15 нмоль/л)	1.35
Стандарт 3 (30 нмоль/л)	1.10
Стандарт 4 (60 нмоль/л)	0.87
Стандарт 5 (120 нмоль/л)	0.63
Стандарт 6 (240 нмоль/л)	0.48

7 ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных значений. При анализе образцов здорового взрослого населения были получены следующие данные.

N	5% Перцентиль	95% Перцентиль
	6.53 нмоль/л	31.09 нмоль/л
	226.24 нг/дл	1077.14 нг/дл

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с имеющимися местными и федеральными правилами. Рекомендуется обеспечивать использование контрольных образцов изо дня в день, с целью постоянной оценки получаемых результатов. Используйте контроли как нормального, так и патологического уровней.

В сертификате Контроля Качества (QC), прилагаемом к набору, описаны контроли и даны соответствующие результаты их проверки в контрольной лаборатории. Контрольные величины в листке Контроля Качества всегда относятся к текущей серии набора, и их следует использовать для прямого сравнения результатов.

Кроме того, чтобы быть уверенными в точности получаемых результатов, рекомендуется применять различные национальные и международные программы оценки качества тестирования.

Для анализа контрольных величин и тенденций их изменения применяйте любые подходящие методы статистической обработки результатов. Если при проведении анализа полученные результаты контрольных материалов не попадают в установленный диапазон разрешенных значений, все результаты пациентов следует считать неправильными.

В таком случае проверьте следующие технические аспекты анализа: точность дозирующих устройств и таймеров; исправность работы фотометра, сроки годности реагентов, соблюдение условий хранения и инкубации, правильность проведения стадий аспирации жидкости из лунок и промывки лунок планшета.

В случае, если в результате указанных проверок, Вы не смогли выявить никаких ошибок, свяжитесь непосредственно с Вашим дистрибьютором компании DRG.

9 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический Диапазон анализа

Составляет 1.63 – 240 нмоль/л.

9.2 Специфичность антител (перекрестная реактивность)

Следующие соединения были проверены на перекрестную реактивность в данном тесте.

Стероид	Перекрестная реакция
Кортикостерон	100 %
Прогестерон	7,4 %
Дезоксикортикостерон	3,4 %
11-дезоксикортикостерон	1,6 %
Кортизол	0,3 %
Прегненолон	0,3 %
Другие стероиды	< 0,1 %

9.3 Чувствительность

Установлено, что наименьшая измеряемая концентрация кортикостерона в данном тесте составляет < 1.63 нмоль/л.

9.4 Воспроизводимость

9.4.1 Внутри анализа

Образец	n	Среднее (нмоль/л)	CV (%)
1	12	108,62	2,77
2	12	79,17	2,44
3	12	24,28	4,08

9.4.2 Между анализами

Образец	n	Среднее (нмоль/л)	CV (%)
1	26	104,42	6,14
2	26	74,83	6,35
3	26	25,17	5,54

9.5 Восстановление

Образец сыворотки	Эндогенный (нмоль/л)	Добавленный (нмоль/л)	Измеренная конц. (нмоль/л)	Ожидаемая конц. (нмоль/л)	Восстановление (%)
1	12,20	0,00	12,50	72,20	95,2
		60,00	68,70		
		30,00	41,20		
		15,00	26,70		
2	42,20	0,00	40,50	102,20	97,0
		60,00	99,10		
		30,00	69,10		
		15,00	59,20		
3	60,62	0,00	63,30	120,62	105,7
		60,00	127,50		
		30,00	95,20		
		15,00	76,30		

9.6 Линейность

Образец	Разведение	Измеренная конц. (нмоль/л)	Ожидаемая конц. (нмоль/л)	Восстановление (%)
1	Неразведенная	157,00	157,00	101,3
	1:2	79,50	78,50	
	1:4	37,80	39,25	
	1:8	20,10	19,63	
2	Неразведенная	55,10	55,10	102,7
	1:2	28,30	27,55	
	1:4	13,20	13,78	
	1:8	6,57	6,89	
3	Неразведенная	27,80	27,80	99,3
	1:2	13,80	13,90	
	1:4	6,90	6,95	
	1:8	3,30	3,48	

10 ОГРАНИЧЕНИЯ В ИСПОЛЬЗОВАНИИ

10.1 Интерферирующие вещества

На результаты теста могут повлиять любое неправильное обращение с образцами или модификации данного теста. В частности нельзя использовать неправильно взятые образцы или образцы, содержащие мешающие добавки, перечисленные в разделе "Сбор образцов".

На результаты анализа не оказывают влияния гемоглобин (в концентрации до 4 мг/мл), билирубин (до 0,125 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл).

10.3 Эффект высокой дозы

В данном тесте не обнаружен эффект высоких доз.

11. ПРАВОВЫЕ ВОПРОСЫ

11.1 Надежность результатов

Тест должен проводиться в точном соответствии инструкциям производителя. Более того, пользователь должен строго придерживаться правил НЛП (надлежащей лабораторной практики), Это особенно важно при использовании контрольных реагентов. Важно всегда включать соответствующее количество контролей при тестировании для подтверждения соответствия и точности теста. Результаты теста действительны только, если все контроли находятся в указанных диапазонах, и если все другие параметры теста также в указанных диапазонах. В случае, когда Вы сомневаетесь, обратитесь к производителю.

11.2 Терапевтические результаты

Терапевтические результаты не должны основываться только на лабораторных данных, даже если все результаты теста соответствуют значениям, указанным в п.11.1. Любой лабораторный результат является только частью клинической картины.

Диагностика инфекционного заболевания не должна основываться на результатах только одного теста. Точный диагноз должен быть поставлен с учетом истории болезни, симптоматики и серологических данных.

Только результаты теста не могут быть основой для терапевтических заключений.

11.3 Ответственность

Любая модификация тестового набора и/или замена или перемена любых компонентов тестового набора могут отрицательно повлиять на результаты теста. Такие действия не дадут права на замену набора.

Любые претензии, связанные с неверной интерпретацией лабораторных результатов, также недействительны. Производитель не несет ответственности за повреждения во время транспортировки.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com