

НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОРТИЗОЛУ МЕТОДОМ ІФА

Cortisol Test System

Кат. №: 3625-300А

Дата випуску інструкції: 16-07-2019
Версія: 4



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВСТУП

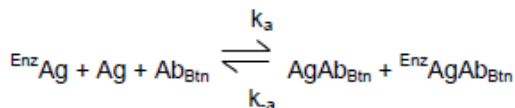
Призначення: Кількісне визначення концентрації загального кортизолу в сироватці або плазмі за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Конкурентний імуноаналіз (тип 7):

Реагенти, що вимагаються для твердофазового імуноферментного аналізу, включають антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген. При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югату фермент-антиген і нативного антигену, що міститься в сироватці, відбувається конкуренція між нативним антигеном зразка та кон'югатом фермент-антиген за обмежене число іммобілізованих сайтів зв'язування. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



Ab_{Btn} = Біотинильовані антитіла (постійна кількість)

Ag = нативний антиген (змінна кількість)

EnzAg = кон'югат фермент-антиген (постійна кількість)

AgAb_{Btn} = комплекс антиген-антитіло

$\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$ = комплекс кон'югат - антитіла

k_a = константа швидкості асоціації

k_{-a} = константа швидкості дисоціації

$K = k_a/k_{-a}$ = константа рівноваги

Відбувається реакція між біотином, пов'язаним з антитілами і стрептавідином, іммобілізованим в лунках мікропланшетів. Це дозволяє відокремити фракцію, пов'язану з антитілами, при декантації або аспірації.

$\text{AgAb}_{\text{Btn}} + \text{EnzAgAb}_{\text{Btn}} + \text{Стрептавідин}_{\text{C.W.}} \Rightarrow$ Іммобілізований комплекс

$\text{Стрептавідин}_{\text{C.W.}}$ = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = "сендвіч"-комплекс, пов'язаний з твердою фазою (поверхнею лунок)

Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл обернено пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація в зразках.

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. Калібратори Кортизолу - 1 мл (мл)/флакон

Шість флаконів референсної сироватки для Кортизолу з концентраціями 0 (A), 1.0 (B), 4.0 (C), 10.0 (D), 20.0 (E) та 50.0 (F) мкг/дл (µg/dl). Зберігати при 2-8 °C (°C). Містить консерванти.

B. Ферментний реагент Кортизолу - 7.0 мл (мл)/флакон

Один (1) готовий до використання флакон, що містить кон'югат Кортизол (аналог)-пероксидаза хрому (HRP), у матриці, що стабілізує білок, з буфером, червоним барвником, консервантом та інгібіторами зв'язування білка. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

C. Біотиновий реагент Кортизолу - 7.0 мл (мл)

Один (1) флакон, що містить біотинильований кон'югат анти-кортизолу mIgG у буфері, барвник та консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

D. Планшет, покритий стрептавідином - 96 лунок

Один 96-луноквий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл (µg/ml) стрептавідину і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ПАВ в буферному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

F. Субстрат А - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

G. Субстрат В - 7 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°C).

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Уникайте тривалого впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні протягом шістдесяти (60) днів при зберіганні при 2-8 °C (°C). Набір і стабільність компонентів визначені на етикетці.

Зауваження 3: Перераховані реагенти призначені для одного 96-луноквого мікропланшета.

4.1 Необхідні матеріали, що не постачаються з набором

1. Мікродозатори на 25, 50 та 100 мкл (µl) з точністю не гірше 1.5%
2. Диспенсери на 50, 100 та 350 мкл (µl) з точністю не гірше 1.5%
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm)
5. Фільтрувальний папір для просушування планшета
6. Поліетиленова плівка чи кришка для інкубації мікропланшета
7. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивання
8. Таймер
9. Контрольні матеріали

5.0 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in vitro
Не для внутрішнього або зовнішнього використання
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 2nd Edition, 1988, NHS Publication No. (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати місцевим нормативним та законодавчим вимогам.

6.0 ЗАБІР ТА ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками слугує кров, у вигляді сироватки чи плазми. Забір крові здійснюйте з дотриманням звичайних правил при венепункції. Для порівняності з встановленими нормальними величинами рекомендується отримати зразки сироватки ранком натщесерце. Зберіть кров в пробірці для венепункції з червоною кришечкою без добавок чи антикоагулянтів (для сироватки) чи в пробірці з ЕДТА або гепарином для плазми. Дозвольте крові згорнутись (для сироватки). Відцентрифугуйте зразок для відділення сироватки чи плазми від клітин.

У пацієнтів, які отримували терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (ng)/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити зразок натщесерце.

Зразки можуть бути охолоджені до 2-8 °C (°C) на термін максимум 5 днів. Якщо зразки не досліджуватимуться в цей час, зберігайте їх при -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторних циклів розморожування/заморожування. При тестуванні в дублях необхідно 0.050 мл (мл) зразка.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролі відповідно з низьким, нормальним і високим діапазоном для відстеження характеристик набору. Ці контролі повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик поставлених реагентів. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або деградацію реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Буфер для промивання

Розведіть концентрат промивного буфера в підходящому посуді, до 1000 мл (ml) дистильованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

2. Робочий Субстратний розчин - стабільний 1 рік.

Змішайте Субстрати, виливши вміст коричневого флакона з Субстратом А у флакон Субстрату В. Закрийте суміш жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть флакон «Робочий розчин субстрату». Розчин зберігається при 2-30 °C (°C).

Зауваження 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він синього кольору.

Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти та контролі повинні досягнути кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

****Процедуру тестування повинен виконувати кваліфікована особа або навчений фахівець****

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть смужки, які не використовуються, в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
2. Додайте по 0.025 мл (ml) (25 мкл (μl)) стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) Ферментного кон'югату Кортизолу в кожну лунку.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
5. Додайте 0.050 мл (ml) (50 мкл (μl)) Біотинового Реагенту Кортизолу в усі лунки.
6. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд.
7. Накрийте мікропланшет пластиковою плівкою і інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
8. Видаліть вміст лунок декантацією або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантація.
9. Додайте 350 мкл (μl) буфера для промивок (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів (уникайте утворення повітряних бульбашок). Видалити промивний розчин і повторити це 2 рази.
10. Додайте по 100 мкл (μl) Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. «Приготування реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУВАТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

11. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
12. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл (μl) стоп-розчину і перемішайте лунки протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
13. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

Зауваження: Зразки з концентрацією вище 50 мкг/дл (μg/dl) необхідно розвести в 5 або 10 разів «0» калібратором Кортизолу.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації Кортизолу в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

1. Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на міліметровому папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного

стандарту в залежності від концентрації Кортизолу в мкг/дл (μg/dl) (не розраховуйте середнього значення до побудови).

3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву за побудованими точками.
4. Визначте невідомі концентрації Кортизолу у зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.071 перетинає стандартну криву при 10.2 мкг/дл (μg/dl) (див. мал.1)

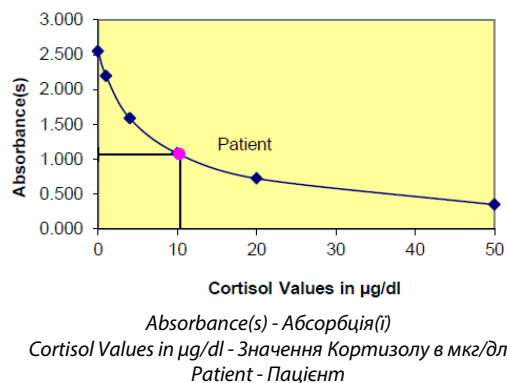
Примітка: Програмне забезпечення для розрахунку даних комп'ютера, призначене для аналізу ІФА, також може використовуватися для розрахунку даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

| Зразок | Лунка | Абсорбція (A) | Середнє абсорбції (B) | Значення (мкг/дл (μg/dl)) |
|--------------|-------|---------------|-----------------------|---------------------------|
| Калібратор А | A1 | 2.483 | 2.543 | 0 |
| | B1 | 2.575 | | |
| Калібратор В | C1 | 2.150 | 2.194 | 1.0 |
| | D1 | 2.186 | | |
| Калібратор С | E1 | 1.573 | 1.585 | 4.0 |
| | F1 | 1.597 | | |
| Калібратор D | G1 | 1.103 | 1.084 | 10 |
| | H1 | 1.065 | | |
| Калібратор E | A2 | 0.726 | 0.725 | 20 |
| | B2 | 0.724 | | |
| Калібратор F | C2 | 0.347 | 0.350 | 50 |
| | D2 | 0.353 | | |
| Контроль 1 | E2 | 1.624 | 1.617 | 3.74 |
| | F2 | 1.611 | | |
| Контроль 2 | G2 | 0.770 | 0.760 | 18.57 |
| | H2 | 0.749 | | |
| Пацієнт | A3 | 1.056 | 1.071 | 10.24 |
| | B3 | 1.086 | | |

*Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу вважаються дійсними лише при виконанні наступних критеріїв:

1. Оптична густина Калібратора 0 мкг/дл (μg/dl) повинна бути ≥ 1.8
2. Чотири з шести контролів якості повинні впадати в установлені інтервали.

12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналіз ризику для цього продукту доступна на запит від Monobind Inc.

12.1 Якість набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.

- Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
- Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
- Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
- Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
- Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
- Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
- Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з Monobind@monobind.com.

12.2 Інтерпретація результатів

- Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись професіоналами.**
- Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
- Реагенти для процедури були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та тест-реаكتивами може спричинити помилкові результати. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів. (Boscato LM Stuart MC. «Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імуноферментних досліджень». Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей слід використовувати результати цього аналізу в поєднанні з клінічним обстеженням, анамнезом пацієнта та всіма іншими клінічними результатами.
- Для отримання дійсних результатів адекватні контролю та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
- Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
- Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
- Значення загального кортизолу в сироватці крові можуть залежати від таких умов, як час доби для відбору проб або введення преднізолону або преднізону (структурно пов'язаного з кортизолом). Слід дотримуватися обережності під час інтерпретації рівня кортизолу для пацієнтів, які отримують терапію цими та іншими структурно спорідненими кортикостероїдами, такими як кортизон або кортикостерон.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Було проведено дослідження нормальної дорослої популяції для визначення очікуваних значень для тестової системи кортизолу AccuBind® ІФА. Середні (R) значення, стандартні відхилення (σ) та очікувані діапазони (± 2σ) представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Очікувані значення для тест-системи Кортизолу (мкг/дл (µg/dl))

| Популяція | Ранок | Після обіду |
|---------------|-------|-------------|
| Дорослі | 5-23 | 3-13 |
| Діти | 3-21 | 3-10 |
| Новонароджені | 1-24 | |

Зверніть увагу: Нормальні результати можуть відрізнитися від лабораторії до лабораторії.

Важливо пам'ятати, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за даним методом для сукупності «нормальних» осіб, залежить від безлічі факторів: специфіки методу, сукупності перевірених осіб і точності методу в руках аналітика. З цієї причини кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановленого виробником лише до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод з популяцією корінного населення області, в якій знаходиться лабораторія.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність аналізу та тестування тестової системи Кортизол AccuBind® ІФА визначалася за допомогою аналізу на трьох різних рівнях пулу контрольних сироваток. Кількість, середні значення, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 2 та 3.

ТАБЛИЦЯ 2
Точність в аналізі (мкг/дл (µg/dl))

| Зразок | N | x | δ | C.V., % |
|------------|----|------|------|---------|
| Низький | 16 | 3.4 | 0.28 | 8.2 % |
| Нормальний | 16 | 14.2 | 0.91 | 6.4 % |
| Високий | 16 | 36.5 | 2.23 | 6.1 % |

ТАБЛИЦЯ 3
Точність між аналізами (мкг/дл (µg/dl))

| Зразок | N | x | δ | C.V., % |
|------------|----|------|------|---------|
| Низький | 10 | 3.1 | 0.30 | 9.7% |
| Нормальний | 10 | 15.1 | 1.06 | 7.0% |
| Високий | 10 | 37.4 | 2.71 | 7.3% |

*вимірювання проводились в десяти експериментах в дублях протягом 10 днів.

14.2 Чутливість

Чутливість методу - 91.5 пг (pg) для даного набору. Це еквівалентно зразку з концентрацією 0.366 мкг/дл (µg/dl) для даного набору. Межа виявлення визначена статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту (мкг/дл (µg/dl)) плюс 2σ (σ-стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним хемілюмінесцентним методом. Використовувалися зразки з низьким, середнім і високим вмістом кортизолу (діапазон значень 0.4-95 мкг/дл (µg/dl)). Загальне число зразків було 202. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референсним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4
Лінійна регресія

| Метод | Середнє (x) | Рівняння | Коефіцієнт кореляції |
|-------------|-------------|----------------|----------------------|
| Цей метод | 16.6 | $y = -0.228 +$ | 0.984 |
| Референсний | 16.8 | $1.0186(x)$ | |

Було знайдено лише незначне розходження даного методу і референс-методу, що доводять близькі середні значення. Рівняння і коефіцієнт кореляції показують чудову узгодженість методів.

14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл з різними речовинами оцінювалися додаванням інтерферуючих речовин у різних концентраціях до сироваткової матриці. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою, необхідною для заміщення цієї кількості речовини.

| Речовина | Перекрестна реактивність |
|--------------------|--------------------------|
| Кортизол | 1.0000 |
| Андростенедіон | 0.0004 |
| Кортизон | 0.2300 |
| Кортикостерон | 0.1800 |
| 11-Деооксикортизол | 0.0550 |
| Дексаметазон | 0.0001 |
| Прогестерон | 0.0002 |
| 17α-ОН Прогестерон | Не визначається |
| ДГЕА | Не визначається |
| Естрадіол | Не визначається |
| Естрон | Не визначається |
| Даназол | Не визначається |
| Тестостерон | Не визначається |



ВИРОБНИК

| | |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>MONOBIND INC.</i> | <i>МОНОБАЙНД ІНК</i> |
| <i>100 North Pointe Dr.</i> | <i>100 Норд Поїнт Драйв</i> |
| <i>Lake Forest, CA 92630 - USA</i> | <i>Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США</i> |
| <i>Phone: 949.951.2665</i> | <i>Тел.: 949.951.2665</i> |
| <i>Fax: 949.951.3539</i> | <i>Факс: 949.951.3539</i> |
| www.monobind.com | www.monobind.com |



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

