НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ ЗАГАЛЬНОГО КОРТИЗОЛУ

6101-15, Cortisol ELISA

Каталог. №: ***6101-15*** *Методика від* ***04-10-2013***
Кількість : ***96***
Виробник : ***DAI, (США)***

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

Аналіз	Cortisol ELISA
Метод	Імуноферментний аналіз твердої фази
Принцип	Конкурентний ІФА
Діапазон виявлення	0-50 мкг/дл
Зразок	25 мкл
Загальний час	~ 75 хвилин
Термін придатності	12-14 місяців
Специфічність	97 %
Чутливість	0.25 мкг/дл

ПРИЗНАЧЕННЯ
Кількісне визначення концентрації загального кортизолу в сироватці або плазмі людини за допомогою ІФА.

РЕЗЮМЕ І ОПИС *(Див. оригінал інструкції).*

ПРИНЦИП ТЕСТУ
Конкурентний Ферментний Імуноаналіз (ТИП 7):
Необхідні реагенти для імуноферментного аналізу включають антитіла, кон'югат фермент-антитіло і нативний антиген.
При змішуванні біотинильованих антитіл, кон'югата фермент-антиген і сироватки, яка містить нативний антиген, відбувається реакція між нативним антигеном і кон'югатом за обмежену кількість зв'язуючих сайтів. Взаємодія описується таким рівнянням:

$$^{Enz}Ag + Ag + Ab_{Btn} \underset{k_{-a}}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AgAb_{Btn} + {}^{Enz}AgAb_{Btn}$$

Ab Btn= Біотинильоване антитіло (постійна кількість)
Ag = Нативний антиген (змінна величина)
Enz Ag = Кон'югат Фермент-антиген (Постійна кількість)
Ag Ab Btn = Комплекс Антиген-Антитіло
Enz Ag Ab Btn = Комплекс Кон'югат-антитіло
Ka = Постійна Асоціації
K-a = Постійна дисоціації
K = Ka/K-a = Константа рівноваги

Відбувається одночасна реакція між біотином, приєднаним до антитіла, і Стрептавідином, іммобілізованим в лунках. Це впливає на поділ фракції пов'язаних антитіл після декантування або аспірації.

$$AgAb_{Btn} + {}_{Enz}AgAb_{Btn-} + StreptavidinC.W. \Rightarrow immobilized\ complex$$

Стрептавідин CW = Стрептавідин, іммобілізований в лунках
Іммобілізований комплекс = «Сендвіч»-комплекс, пов'язаний з твердою фазою

Активність ферменту в лунці обернено пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи декілька різних сироваток з відомою концентрацією антигену, може бути побудована калібрувальна крива, з якої визначається концентрація антигену невідомих зразків.

ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ
В даному аналізі можна використовувати зразки крові, сироватки або плазми за типом і звичайні застережні заходи при заборі крові з вени повинні бути дотримані. Для точного порівняння при встановленні нормальних значень, необхідно взяти зразок ранішньої сироватки натще. Кров повинна бути зібрана в пробірки для забору крові з вени з червоним верхом (з або без добавлення гелю) або з використанням для плазми вакуумної трубки, що містить гепарин. Для зразків сироватки дайте крові згорнутися. Центрифугувати зразок для відділення сироватки або плазми з клітин.
Проби можуть зберігатися в холодильнику при 2-8 °C протягом не більше 5 (п'яти) днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, зразки можуть зберігатися при температурі -20 °C протягом до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникати повторного заморожування і відтавання. При аналізі в дублікатах потребується 0.050 мл зразка.

Підготовка реагентів
1. **Робочий Ферментний Реагент**
   Відміряти 0,7 мл Ферментного реагенту кортизолу і додати у флакон, що містить Буфер Кон'югованого Стероїду. Зберігати при температурі 2-8 ° C.
2. **Буфер для промивання**
   Розвести вміст розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою в підходящому для зберігання контейнері. Розведений буфер можна зберігати при кімнатній температурі (20-27 ºC) на протязі до 60 днів.
3. **Розчин Робочого Субстрату**
   Вилийте вміст бурштинового флакону Розчину "A" в чистий флакон для Розчину "B". Закрити жовтою кришкою чистий флакон для полегшення ідентифікації. Перемішати і відповідно позначити. Зберігати при температурі 2-30 °C.

Примітка:
1. Не використовувати робочий субстрат, якщо він синього кольору.
2. Не використовувати реагенти, які забруднені, або мають зростання бактерій.

МАТЕРІАЛИ І КОМПОНЕНТИ
Матеріали, що поставляються в наборі
Реактивні Реагенти
1. **Калібратори Кортизолу – 1мл/флакон:**
   Шість (6) пробірок контрольної сироватки для кортизолу в концентраціях 0 (**A**), 1.0 (**B**), 4.0 (**C**), 10.0 (**D**), 20.0 (**E**) і 50.0 (**F**) мкг/дл. Зберігати при температурі 2-8 °C. Консервант був доданий.
2. **Ферментний Реагент Кортизолу - 1.0 мл/флакон:**
   Один (1) флакон Кон'югату Кортизол (аналоговий) - Пероксидаза хрону (HRP) в протеїн-стабілізуючій матриці із зеленим барвником. Зберігати при температурі 2-8 °C.
3. **Буфер Стероїдного Кон'югату – 7.0 мл/флакон:**
   Один (1) флакон Буферу, що містить реагент, червоний барвник, консервант і зв'язуючи інгібітори білка. Зберігати при температурі 2-8 °C.
4. **Реагент Біотинильованого Кортизолу – 7.0 мл:**
   Одна (1) пляшка реагенту, що містить біотинильований кон'югат анти-кортизолу IgG в буфері, зелений барвник і консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.
5. **Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок:**
   Один 96-лунковий мікропланшет, покритий 1.0 мкг/мл Стрептавідину в алюмінієвій упаковці з осушувачем. Зберігати при температурі 2-8 °C.
6. **Концентрат Промивного Розчину - 20 мл:**
   Одна (1) пробірка, що містить сурфактант в буферному розчині. Консервант був доданий. Зберігати при температурі 2-8 °C.
7. **Субстрат А – 7 мл/флакон:**
   Один (1) флакон, що містить Тетраметилбензидин (TMB) в буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C.
8. **Субстрат В – 7 мл/флакон:**
   Одна (1) пляшка, що містить перекис водню (H_2O_2) в буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C.
9. **Стоп - розчин – 8 мл/флакон:**
   Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при температурі 2-30 °C.
10. **Вкладиш інструкції**

Зауваження:
1. Не використовувати реагенти після закінчення строку придатності.
2. Відкриті реагенти стабільні на протязі 60 днів при зберіганні при 2-8 °C. стабільність вказана на етикетках.
3. Вищеперераховані реагенти призначені для використання з одним 96-лунковим мікропланшетом.

Необхідні, але не надані матеріали
1. Піпетки, здатні до точного розподілу 25 мкл, 50 мкл і 100 мкл з точністю, кращою ніж 1.5 %.
2. Диспенсери для повторного розподілу об'ємів 0.100 мл і 0.350 мл з точністю, кращою ніж 1.5 %.
3. Диспенсери для об'ємів (200-1000 мкл) для кон'югату.
4. Мікропланшетний Вошер або Промивна пляшка.

5. Мікропланшетний зчитувач з довжиною хвилі 450 нм і 620 нм.
6. Паперові рушники.
7. Плівка для інкубації.
8. Вакуумний аспіратор (опційно) для промивних кроків.
9. Таймер.
10. Матеріали контролю якості.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перед проведенням тесту привести всі реагенти, контролі і калібратори сироватки до кімнатної температури (20-27 ºC).

****Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованим персоналом.**

1. Підготувати лунки мікропланшету для калібраторів, контролей і зразків пацієнтів для аналізу в дублікаті.
   Помістіть невикористані смужки назад в алюмінієву упаковку, закрийте її і зберігайте при температурі 2-8 °C.
2. Піпетувати 0.025 мл (25 мкл) відповідного калібратора, контролю або взірця в підготовлені лунки.
3. Додати 0.050 мл (50 мкл) Робочого реагенту Кортизолу в усі лунки.
4. Обережно потрясти планшет протягом 20-30 секунд для ретельного змішування.
5. Додати 0.050 мл (50 мкл) Біотинильованого реагенту Кортизолу в усі лунки.
6. Обережно потрясти планшет протягом 20-30 секунд для ретельного змішування.
7. Накрити кришкою і витримати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
8. Видалити вміст мікропланшетів декантацією або аспірацією. При декантуванні промокніть планшет абсорбуючим папером.
9. Додати 350 мкл розчину для промивання (див. розділ про підготовку реагентів), декантувати або аспірувати. Повторити два (2) рази, щоб в цілому було три (3) промивання. **Можна використовувати автоматичний або ручний пристрій для промивання. Дотримуйтесь інструкції виробника щодо експлуатації. Якщо використовується диспенсерна пляшка, наповніть кожну лунку стисненням пляшки (уникайте повітряних бульбашок) для промивки. Декантувати промивний розчин і повторити два (2) рази.**
10. Додати 0.100 мл (100 мкл) субстрату реагенту в усі лунки. **Завжди додавати реагенти в такому ж порядку, щоб мінімізувати відмінність реакції між лунками.**
    НЕ ТРЯСТИ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ.
11. Інкубувати при кімнатній температурі протягом п'ятнадцяти (15) хвилин.
12. Додати 0.050 мл (50 мкл) стоп розчину в кожну лунку і обережно перемішати протягом 15–20 секунд**. Завжди додавати реагенти в такому ж порядку, щоб мінімізувати відмінності в часі реакції між лунками.**
13. Зчитати абсорбцію в кожній лунці при 450 нм (використовуючи контрольну довжину хвилі 620-630 нм). **Вимірювання повинно проводитися протягом тридцяти (30) хвилин після зупинки реакції.**

Примітка: Розвести зразки з концентраціями вище 50 мкг/дл 1:5 і 1:10 з '0' Кортизолом мкг/дл сироватки пацієнта.

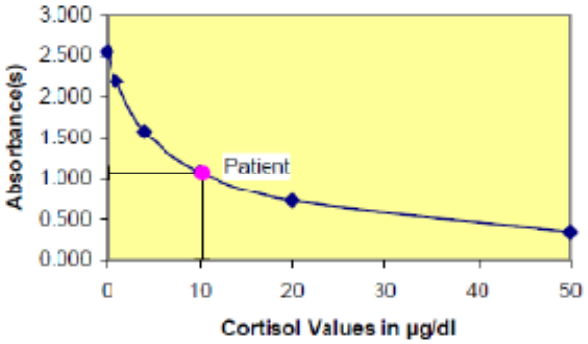
РЕЗУЛЬТАТИ

Калібрувальну криву використовують для отримання концентрацій Кортизолу в невідомих зразках.

1. Запишіть абсорбцію, отриману з роздруківки микропланшетного рідера, як описано в прикладі 1.
2. Позначте точками абсорбцію кожного з дублікатів стандартної сироватки проти відповідної концентрації Кортизолу в мкг/дл на міліметровому папері (не вираховувати середнє значення дублікатів стандартів сироватки перед відкладанням на кривій).
3. З'єднати точки в найбільш підходящу криву.
4. Для визначення концентрацій Кортизолу для невідомих зразків відмітьте середню абсорбцію дублікатів кожного невідомого зразка на вертикальній вісі, знайдіть точку перетину з вертикальною віссю графіка, знайдіть точку перетину кривої і концентрації (в мкг/дл) з горизонтальною віссю (дублікати невідомих зразків можуть бути усереднені, як зазначено). У наступному прикладі, середня щільність (1.071) перетинає криву при концентрації Кортизолу (10.2 нг/дл) (див. Малюнок 1).

Sample I.D.	Well Number	Abs (A)	Mean Abs (B)	Value
Cal A	A1	2.483	2.543	0
	B1	2.575		
Cal B	C1	2.150	2.194	1.0
	D1	2.186		
Cal C	E1	1.573	1.585	4.0
	F1	1.597		
Cal D	G1	1.103	1.084	10
	H1	1.065		
Cal E	A2	0.726	0.725	20
	B2	0.724		
Cal F	C2	0.347	0.350	50
	D2	0.353		
Ctrl 1	E2	1.624	1.617	3.74
	F2	1.611		
Ctrl 2	G2	0.770	0.760	18.37
	H2	0.749		
Patient 1	A3	1.056	1.071	10.24
	B3	1.086		

*Наведені вище дані і таблиця нижче призначені тільки для прикладу. Не використовуйте їх для розрахунку Ваших результатів.



ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Для того, щоб результати аналізу вважалися дійсними, наступні критерії повинні бути виконані:

1. Абсорбція (OD) калібратора 0 в мкг/дл повинна бути ≥ 1.3.
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні знаходитися у встановленому діапазоні.

АНАЛІЗ РИЗИКУ

А. Проведення тесту

1. Важливо, щоб час реакції в кожній лунці підтримувався постійним для досягнення відтворюваних результатів.
2. Піпетування проб не повинно займати більше десяти (10) хвилин, щоб уникнути зсуву результатів тесту.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один (1) планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання розчину субстрату провокує кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп-розчину. Таким чином, субстрат і стоп-розчин мають додаватися в тій же послідовності, щоб усунути будь-які тимчасові відхилення в ході реакції.
6. Планшетний рідер вимірює вертикально. Не торкатися нижньої частини лунок.
7. Недотримання етапу видалення розчину аспірацією або декантуванням може призвести до неточних результатів.
8. Використовуйте компоненти з тієї ж партії. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Точне піпетування, а також дотримання часових проміжків і температурних вимог є суттєвими. Будь-яке відхилення від вказаних інструкцій може привести до неточних результатів.
10. Всі діючі національні стандарти, правила і закони, в тому числі, але не обмежуючись, хороші лабораторні процедури, повинні строго дотримуватись для забезпечення дотримання та правильного використання пристрою.
11. Важливо калібрувати все обладнання, наприклад, Піпетки, читачі, вошери та/або автоматизовані інструменти, які використовуються, і виконувати рутинне профілактичне обслуговування.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Відповідно до встановлених референсних інтервалів для "нормального" населення очікувані діапазони для даного набору докладно представлені в таблиці 1.

Таблиця 1
Очікувані значення для ELISA Кортизол (мкг/дл)

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

Будь ласка, зверніть увагу: Нормальні результати можуть відрізнятися від лабораторії до лабораторії.

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можуть бути визначені даним методом для "нормального" населення, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках аналітика. З цієї причини кожна лабораторія повинна використовувати діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки не буде встановлено власний діапазон шляхом аналізів взірців людей, характерних для району, в якому розташована лабораторія.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

A. Точність

Точність системи аналізу DAI Кортизол в аналізі і між аналізами оцінювалася за допомогою аналізів на трьох різних рівнях контрольної сироватки. Кількість, середнє значення, стандартне відхилення і коефіцієнт варіації для кожної з цих контрольних сироваток представлені в Таблиці 2 і Таблиці 3.

Таблиця 2
Точність в аналізі (мкг/мл)

Взірець	n	X	SD	CV, %
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/мл)

Взірець	n	X	SD	CV, %
Низький	10	3.1	0.30	9.7
Нормальний	10	15.1	1.06	7.0
Високий	10	37.4	2.71	7.3

***** Дані отримані в десяти експериментах у двох примірниках протягом десяти днів.

B. Чутливість

Даний аналіз має чутливість 91.5 пг. Це еквівалентно зразку, що містить концентрації 0.366 мкг/дл. Чутливість була отримана визначенням варіабельності 0 калібратора в мкг/дл з використанням **2σ** (95% точність) для розрахунку мінімальної дози.

C. Точність

Дана тестова система порівнювалась з радіоімунним методом. Біологічні зразки з низьким, нормальним і високим рівнем кортизолу були використані (значення варіювали від 0.4 мкг/дл - 95 мкг/дл). Загальна кількість досліджених зразків 202. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції були розраховані для Кортизолу в порівнянні із звичайним методом. Отримані дані представлені в (табл. 4).

Таблиця 4
Рівняння квадратної регресії

Метод	Середнє (x)	Аналіз	Коефіцієнт кореляції
Даний метод (y)	16.6	У=0.228 + 1.0186(X)	0.984
Референтний (x)	16.8		

D. Специфічність

Перехресна реактивність в % антитіл Кортизолу на обрані речовини оцінювалася шляхом додавання додаткових речовин в матрицю сироватки в різних концентраціях. Перехресну реактивність було розраховано шляхом отримання співвідношення між дозою додаткової речовини і дозою Кортизолу, необхідних для витіснення такої ж кількості міченого аналога.

Substance	Cross Reactivity
Cortisol	1.0000
Androstenedione	0.0004
Cortisone	0.2300
Corticosterone	0.1800
11-Deoxycortisol	0.0550
Dexamethasone	0.0001
Progesterone	0.0002
17 α-OH Progesterone	ND
DHEA	ND
Estradiol	ND
Estrone	ND
Danazol	ND
Testosterone	ND

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі в низькому, нормальному і високому діапазонах для моніторингу проведення аналізу. Ці Контролі повинні розглядатися як невідомі зразки і значення повинні визначатись в кожній процедурі тесту. Дані Контролю якості повинні зберігатися для подальшої перевірки реагентів, що поставляються. Відповідні статистичні методи варто використовувати для з'ясування тенденцій. Кожна лабораторія повинна встановити власні межі аналізу. Крім того, максимальне поглинання має узгоджуватися з попередніми даними. Значне відхилення від показників вказує на непомічену зміну в умовах проведення аналізу або деградацію реагентів в наборі. Свіжі реагенти повинні бути використані, щоб визначити причину відхилень.

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. Для діагностичного використання in vitro.
2. Не для Зовнішнього або Внутрішнього використання на людях або тваринах.
3. Було виявлено, що реагенти, які містять сироватку крові людини, були нереактивними на Поверхневий антиген гепатиту B, ВІЛ-1 і 2 та HCV. Оскільки жоден тест не може дати повної гарантії того, що інфекційні агенти відсутні, всю людську сироватку слід вважати потенційно небезпечною і здатною передавати захворювання.
4. Безпечна утилізація компонентів набору повинна відбуватись у відповідності з місцевими нормативними та законодавчими вимогами.

ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»