



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРТИЗОЛА МЕТОДОМ ИФА

Тест для количественного определения кортизола в
сыворотке человека

Кат.№ CAN-C-270
Производитель: Diagnostics Biochem Canada Inc., (Канада)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

Методика от 26-10-2010
Версия 5.0

Только для использования в исследовательских целях. Не для
использования в диагностике

ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения кортизола в сыворотке человека методом иммуноферментного анализа.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод основан на обычном иммуноферментном анализе с использованием конкурентного связывания. Немеченый антиген (присутствующий в образцах, контролях и стандартах) и меченый ферментом антиген (конъюгат) во время инкубации конкурируют за ограниченное количество сайтов связывания антител, иммобилизованных в лунках микропланшета. Затем, после промывки, добавляется ферментный субстрат. Энзиматическая реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Абсорбция измеряется с помощью микропланшетного анализатора. Интенсивность окрашивания, сформировавшегося в ходе энзиматической реакции, обратно пропорциональна концентрации дигидротестостерона в образце. Для построения калибровочной кривой используется набор стандартов. Концентрация дигидротестостерона в исследуемых образцах может быть рассчитана непосредственно из калибровочной кривой.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Кортизол – это стероид, циркулирующий в кровотоке в наиболее высоких количествах, основной глюкокортикоид, секретлируемый корой надпочечников. Физиологический эффект кортизола проявляется в поддержании кровяного давления, оказывает противовоспалительное действие. Кроме того, он вовлечен в процесс абсорбции кальция, глюконеогенез, секрецию желудочного сока и пепсина.

Измерения уровня кортизола в крови могут быть использованы для индикации функции надпочечников и дифференциальной диагностики заболеваний Аддисона и Кушинга, а также гиперплазии и карциномы надпочечников.

Большая часть циркулирующего кортизола связана с кортизолсвязывающим глобулином или транскортином. Следовательно, выводимое с мочой количество свободного кортизола очень мало, и для получения достоверных результатов при измерении кортизола в моче необходим 24-часовой сбор мочи. Уровень кортизола в крови подчиняется суточному ритму, достигает максимального значения утром, а минимального – ночью.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для успешного проведения анализа необходимо полное понимание данной инструкции пользователями. Достоверные результаты могут быть получены только при строгом и тщательном соблюдении данной инструкции, поставляемой с набором.
2. Контрольные материалы или пулы сывороток с высоким и низким значениями должны быть включены в каждую постановку для оценки достоверности результатов.
3. Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.
4. Для того чтобы избежать контакта с потенциально опасными веществами, необходимо надевать перчатки при работе с реагентами набора и образцами сывороток.
5. Все образцы и реагенты набора должны достичь комнатной температуры и быть аккуратно, тщательно перемешаны перед

- использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
6. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.
7. Контроли должны быть включены в каждую постановку. Их значения, полученные при тестировании, должны соответствовать указанному диапазону допустимых значений.
8. Неточное соблюдение процедур, техники анализа, неточное пипетирование, неполные промывки, а также несоблюдение условий хранения реагентов набора может привести к недостоверным результатам, к тому, что результат, полученные для контроля, не попадет в диапазон допустимых значений.
9. Присутствие пузырьков воздуха в лунках микропланшета влияет на результаты при считывании оптической плотности (ОП) с использованием микропланшетного анализатора. Перед считыванием результатов тщательно удалите все пузырьки с поверхности жидкости.
10. Раствор субстрата (ТМВ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным при правильном хранении. Нестабильность или загрязнение реагента могут проявиться в вид окрашивания реагента в голубой цвет. В этом случае реагент использовать нельзя.
11. При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
12. Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
13. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
14. Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения кортизола в сыворотке человека. Данный набор не предназначен для определения кортизола в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Не используйте образцы с сильным гемолизом, липемией, желтухой, или неправильно хранившиеся образцы.
3. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тиомерозал не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
4. Для разведения сывороток с высокими концентрациями может быть использован только калибратор А. Использование любого другого реагента может привести к ложным результатам.
5. Результаты, полученные с помощью данного набора, никогда не должны использоваться как единственное основание для постановки диагноза. Например, присутствие гетерофильных антител у пациентов, регулярно контактирующих с животными или с материалами животного происхождения, потенциально может влиять на результаты иммунологического анализа. Следовательно, клиническая диагностика должна базироваться на полном обследовании пациента, учитывая, в том числе, интенсивность контактов с животными/продуктами, если можно подозревать ложные результаты.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНО БИООПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Сыворотка человека, которая могла быть использована при приготовлении реагентов, стандартов и контролей, была протестирована с отрицательными результатами на содержание поверхностного антигена гепатита В, антител к ВИЧ и вирусу гепатита С. Однако не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие таких инфекционных агентов как ВИЧ, гепатит В, С и других. Таким образом, реагенты должны рассматриваться как биологически опасные материалы и обращаться с ними необходимо в соответствии с нормами, принятыми в лаборатории для образцов крови.

ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ

Избегайте контактов с реагентами, содержащими ТМВ, перекись водорода и соляную кислоту. При контакте с такими реагентами тщательно промойте место контакта большим количеством воды. ТМВ может быть канцерогенным веществом.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для проведения анализа в дублях необходимо приблизительно 0.1 мл сыворотки. Соберите 4-5 мл крови в соответствующую надписанную пробирку и дайте ей свернуться. Центрифугируйте и аккуратно соберите сыворотку. Храните при 4°C не более 24 часов. Для более длительного хранения необходимо заморозить образец при температуре -10°C или ниже. Считайте все образцы крови человека потенциально инфекционно опасными и обращайтесь с ними с соответствующими предосторожностями.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Подготовка образцов не требуется.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Дозаторы на 20, 50, 100, 150 и 300 мкл
2. Одноразовые сменные наконечники
3. Деионизированная или дистиллированная вода
4. Микропланшетный шейкер
5. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 450 нм и верхним пределом ОП 3.0 или более* (см. шаг 10 процедуры)

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. Микропланшет, покрытый кроличьими антителами анти-Кортизол (с «ломаемыми» стрипами) - 96-ячеечный микропланшет (8x12), покрытый поликлональными антителами в закрываемом пакете с осушителем. Готов к использованию.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °C

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

2. Концентрат конъюгата Кортизол-пероксидаза хрена (HRP) – требует приготовления.

Содержание: Конъюгат Кортизол-HRP в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 300 мкл во флаконе

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °C

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Перед использованием развести концентрат в соотношении 1:100 в рабочем буфере (например, 20 мкл HRP в 2 мл буфера для анализов). При использовании всего микроплшета разведите 120 мкл HRP в 12 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

3. Калибраторы Кортизола - готовы к использованию.

Содержание: 7 флаконов, содержащих Кортизол в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлены добавлением известных количеств Кортизола в матрикс.

* В таблице приведены приблизительные концентрации, точные значения указаны на этикетках флаконов.

Калибратор	Концентрация (мкг/дл)	Объем/флакон (мл)
Калибратор А	0	1.0
Калибратор В	0.5	0.3
Калибратор С	2	0.3
Калибратор D	5	0.3
Калибратор E	10	0.3
Калибратор F	30	0.3
Калибратор G	60	0.3

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °C

Стабильность: невскрытые флаконы хранятся 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия калибраторы должны быть использованы в течение 14 дней или аликвотированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

4. Контроли – готовы к использованию.

Содержание: 2 флакона, содержащие Кортизол в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлен с добавлением определенного количества Кортизола в буфер. Ожидаемое значение и допустимый диапазон указаны на этикетке флакона.

Объем: 0.3 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °C

Стабильность: невскрытый флакон хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия контроль должен быть использован в течение 14 дней или аликвотированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

5. Концентрат промывочного буфера – требует приготовления.

Содержание: 1 флакон, содержащий буфер с неионным детергентом и консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 50 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Развести в соотношении 1:10 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. Если для анализа используется весь микропланшет, разведите 50 мл концентрата промывочного буфера 450 мл воды.

6. Рабочий буфер – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий белковый буфер с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 15 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

7. Субстрат ТМБ – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий тетраметилбензидин и перекись водорода в не-DMF или DMSO содержащем буфере.

Объем: 16 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

8. Стоп-раствор – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий 1M серной кислоты.

Объем: 6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Подготовка образцов:

Не требуется

Все реагенты привести к комнатной температуре перед использованием. Калибраторы, контроли и образцы должны тестироваться в дублях. Вся процедура анализа должна проводиться непрерывно.

1. Приготовить рабочие растворы конъюгата Кортизол-HRP и промывочного буфера.
2. Отделить требуемое количество микролуночных полосок. Неиспользуемые полоски запечатать обратно в пакет и поместить в холодильник.
3. Пипетировать по 20 мкл калибратора, контроля и образца в дублях в помеченные ячейки.
4. Пипетировать 100 мкл конъюгата рабочего раствора в каждую лунку (рекомендуется использование мультисканальной пипетки).
5. Инкубировать в течение 45 минут (приблизительная скорость 200 об/мин) при комнатной температуре на шейкере.
6. Промыть лунки 3 раза с 300 мкл разбавленного промывочного раствора на каждую лунку и постучать микропланшетом по фильтровальной бумаге, убедиться, что он сухой (рекомендуется использование автоматического промывочного устройства).
7. Пипетировать 150 мкл Субстрата ТМБ в каждую лунку с одинаковой скоростью.
8. Инкубировать на шейкере в течении 15-20 минут при комнатной температуре (или до тех пор, пока калибратор А не достигнет темно-синего окраса для необходимой ОП).
9. Пипетировать 50 мкл стоп раствора в каждую лунку с одинаковой скоростью как в шаге 7.
10. Определить ОП ячеек с помощью микропланшетного ридера при 450 нм в течение 20 минут после добавления стоп раствора.

*если ОП выходит за верхний предел обнаружения или если фильтр в 450 нм недоступен, можно использовать фильтр с длиной волны 405 или 415 нм. ОП будут ниже, но это не повлияет на результаты.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого калибратора.
2. Постройте калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности калибраторов, а по оси X - их

концентрацию. Если возможно, рекомендуется использование программного обеспечения для построения 4-параметрической или 5-параметрической калибровочной кривой.

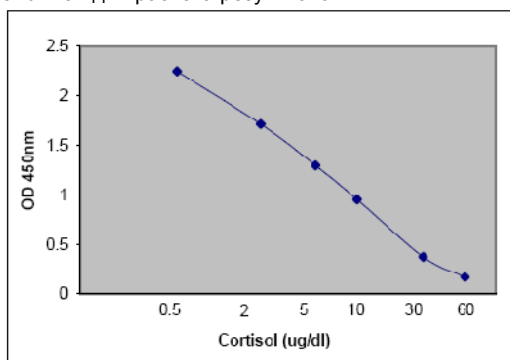
3. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.
4. Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой.
5. Если результат превышает 60 мкг/дл, образец необходимо развести стандартом А в соотношении не более чем 1:8. Полученный результат необходимо умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, СВЕДЕННЫЕ В ТАБЛИЦУ:

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Значение (пг/мл)
A	2.263	2.183	2.223	0
B	2.071	2.001	2.036	0.5
C	1.717	1.719	1.718	2
D	1.382	1.402	1.395	5
E	0.985	0.933	0.959	10
F	0.385	0.373	0.379	30
G	0.174	0.176	0.175	60
неизвестный	0.697	0.722	0.710	15.3

ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Приводится только в демонстрационных целях и не должен использоваться для расчета результатов.



РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность:

Нижний предел обнаружения рассчитан исходя из калибровочной кривой вычитанием двух стандартных отклонений из среднего значения ОП нулевого стандарта (стандарт А), измеренного 10 раз. Чувствительность метода dbc Direct Cortisol ELISA составила **0.4 мкг/дл**.

Специфичность (перекрестная реактивность):

Перечисленные ниже соединения были протестированы на перекрестную реактивность с помощью данного метода, при 100% перекрестной реактивности для Direct Cortisol ELISA:

Стероид	Перекрестная реактивность, %
Кортизол	100
Преднизолон	13.6
Кортикостерон	7.6
Деоксикортикостерон	7.2
Прогестерон	7.2
Кортизон	6.2
Деоксикортизол	5.6
Преднизон	5.6
Дексаметазон	1.6

Перекрестная реактивность не наблюдалась с дегидроэпандростероном и тетрагидрокортизоном.

Пожалуйста, обратите внимание на то, что наблюдалась перекрестная реактивность с преднизолоном со значением 13.6 %. Так как преднизон преобразовывается в преднизолон *in-vivo*, необходимо быть внимательными при определении уровней кортизола у пациентов, проходящих курс лечения.

Точность внутри серии:

3 образца были проанализированы 10 раз каждый, по одной калибровочной кривой. Результаты (в мкг/дл) приведены ниже:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	1.44	0.14	9.4
2	14.06	0.41	2.9
3	37.55	1.87	5.0

Точность между сериями:

3 образца анализировали 10 раз каждый в течение 4 недель.

Результаты (в мкг/дл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	1.60	0.13	8.1
2	15.01	0.74	5.0
3	38.18	1.43	3.8

Воспроизводимость

Насыщенные образцы были приготовлены добавлением определенных количеств кортизола к трем образцам сыворотки пациентов. Результаты (в мкг/дл) приведены в таблице.

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1 ненасыщенный	3.86	-	-
	+2.0	3.61	123.2
	+10.0	7.63	110.1
	+30.0	16.93	90.4
2 ненасыщенный	6.06	-	-
	+5.0	3.74	114.0
	+10.0	9.06	112.8
	+60.0	32.49	98.4
3 ненасыщенный	10.91	-	-
	+0.5	6.58	115.4
	+5.0	8.74	109.9
	+60.0	39.04	110.3

Линейность

3 образца сыворотки пациентов были разведены калибратором А.

Результаты (в мкг/дл) приведены в таблице.

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1	10.94	-	-
1:2	6.13	5.47	112.1
1:4	3.19	2.74	116.4
1:8	1.55	1.37	113.1
2	18.92	-	-
1:2	9.64	9.46	101.9
1:4	4.61	4.73	97.5
1:8	1.98	2.37	83.7
3	42.00	-	-
1:2	20.44	21.00	97.8
1:4	9.57	10.50	94.0
1:8	4.76	5.25	90.7

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Как и для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений.

Группа	Среднее (мкг/дл)	Диапазон (мкг/дл)
Мужчины и женщины в дневные часы (AM)	15.59	3.95 - 27.23
Мужчины и женщины в ночные часы (PM)	5.93	1.45 - 10.41

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул. Чорновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 612

e-mail: www.diameb.ua

www.biotechlab-s.com.ua