

НАБІР РЕАГЕНТІВ КОРТИЗОЛ (У СЕЧІ) ELISA

Cortisol (Urinary)

Каталог. №: EIA-2989

Дата випуску інструкції: 2019/02

Версія 13.0



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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Конкурентний імуноферментний колориметричний метод для кількісного визначення концентрації вільного Кортизолу у сечі.

Набір призначений тільки для лабораторного використання.

1.1. Клінічне значення

Кортизол - це стероїдний гормон, що вивільняється з кори надниркових залоз у відповідь на гормон під назвою АКТГ (виробляється гіпофізом), він бере участь у реакції на стрес; підвищує артеріальний тиск, рівень цукру в крові, може викликати безпліддя у жінок і пригнічує імунну систему. Кортизол діє через специфічні внутрішньоклітинні рецептори і впливає на численні фізіологічні системи, включаючи імунну функцію, регуляцію глюкози, тонус судин, використання субстрату та кістковий метаболізм. Кортизол виводиться переважно з сечею у незв'язаній (вільній) формі.

Кортизол у плазмі зв'язується з глобуліном, що зв'язує кортикостероїди (СВГ, транскотин), з високою спорідненістю та з альбуміном. Для більшості рецепторів доступний лише вільний кортизол.

Ці нормальні ендogenousні функції є основою для фізіологічних наслідків хронічного стресу - тривала секреція кортизолу викликає втрату м'язів, гіперглікемію та пригнічує імунні/запальні реакції. Ті самі наслідки виникають при тривалому застосуванні глюкокортикоїдних препаратів. Вільна фракція кортизолу являє собою метаболічно активний кортизол. У нормальних умовах менше 1% виводиться з сечею. У патологічних станах (синдром Кушинга) рівень вільного кортизолу в сечі підвищується, оскільки СВГ не зв'язує надлишок плазматичного кортизолу, і він виводиться із сечею.

Під час вагітності або лікування естро-прогестагеном збільшення плазматичного кортизолу, викликане збільшенням вироблення транспортного білка, однак рівень вільного кортизолу в сечі є нормальним, що вказує на правильну сюрренічної функції.

Цей тест є дуже корисним для оцінки справжньої сюрренічної функції, оскільки у дозі вільного кортизолу він є метаболічно активною формою. Крім того, вимірювання вільного кортизолу в сечі є кращим параметром для діагностики синдрому Кушинга.

2. ПРИНЦИП

Кортизол (антиген) у зразку конкурує з антигеном Кортизолом, кон'югованим з пероксидазою хрому (HRP) для зв'язування з обмеженою кількістю антитіл до Кортизолу покритого на мікропланшеті (тверда фаза).

Після інкубації відокремлення зв'язаного/вільного здійснюється простим твердофазним промиванням.

Потім фермент HRP у зв'язаній фракції реагує з субстратом (H₂O₂) і субстратом ТМВ і набуває синього кольору, який змінюється на жовтий при додаванні стоп-розчину (H₂SO₄).

Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації кортизолу у зразку.

Концентрація кортизолу у зразку розраховується за допомогою калібрувальної кривої.

3. РЕАГЕНТИ, МАТЕРІАЛИ ТА ІНСТРУМЕНТАРІЙ

3.1 Реагенти, які постачаються у наборі

1. **Нульовий Стандарт** (S0), 4.0 мл
2. **Стандарти** (S1 – S4), 4 флакони, 1.0 мл кожен
3. **Контролі низький**, 1 флакон, 1.0 мл
Готовий до використання
4. **Контроль високий**, 1 флакон, 1.0 мл
Готовий до використання
5. **Ферментний кон'югат** (1 флакон, 33 мл)

Кортизол кон'югований з пероксидазою хрому (HRP)

6. **Мікротитрові лунки**, 1 роздільний мікропланшет
Антитіло до Кортизолу абсорбоване на мікропланшеті
7. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 15 мл
H₂O₂- ТМВ 0.26 г/л (уникати попадання на шкіру)
8. **Стоп розчин**, 1 флакон, 15 мл
Містить сірчану кислоту 0.15 моль/л (уникати попадання на шкіру)
9. **Промивний розчин** 10X Конц., 1 флакон, 50 мл
0.2 М Фосфатний буфер, Proclin < 0.0015%

3.2 Необхідні реагенти, які не постачаються:

- Дистильована вода

3.3 Допоміжні матеріали та інструментарій

- автоматичний дозатор.
- мікропланшетний зчитувач (450 нм, 620-630 нм)

Примітка

Зберігати реагенти при температурі 2-8°C у темному місці.

Відкривати упаковку реагенту 6 (покритий мікропланшет) тільки тоді, коли він досягнув кімнатної температури та негайно закривати після використання. Після відкриття, мікропланшет стабільний до закінчення терміну придатності набору.

4. ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей набір призначений для in vitro використання тільки фахівцями. Не для внутрішнього чи зовнішнього застосування людям або тваринам.
- Під час роботи з даними реагентами використовувати відповідне захисне обладнання.
- Дотримуватися Відповідної лабораторної практики (GLP) під час обробки продуктів крові.
- Матеріал тваринного походження, використаний для приготування набору, був отриманий від тварин, сертифікованих як здорові, а бичачий білок - з країн, не інфікованих BSE, але ці матеріали слід розглядати як потенційно інфекційні.
- Деякі реагенти містять невеликі кількості Proclin 300® в якості консерванту. Уникайте попадання на шкіру або слизові.
- ТМБ субстрат містить подразник, який може бути шкідливим при вдиханні, поглинанні або всмоктуванні через шкіру. Щоб запобігти травмі, уникайте вдихання, проковтування та попадання на шкіру та очі.
- Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота отруйна та агресивна, та може бути токсичною при попаданні всередину. Щоб запобігти хімічним опікам, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте впливу прямого сонячного світла, металів та окисників на реагент ТМБ/H₂O₂. Розчин не заморожувати.
- Цей метод дозволяє визначити Кортизол від 0.47 нг/мл (LoD) до 200.0 нг/мл.
- Клінічне значення визначення Кортизолу може бути визнано недійсним, якщо пацієнт лікувався кортикостероїдами або природними чи синтетичними стероїдами.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Будь ласка, чітко дотримуйтеся послідовності кроків піпетування, передбачених у цьому протоколі. Дані про ефективність були отримані за допомогою використання специфічних реагентів, які перелічені у цій інструкції з використанням.
- Всі реагенти слід зберігати у холодильнику при температурі 2°C - 8°C в оригінальному контейнері. Будь-які винятки чітко вказані. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності за умови зберігання та використання як зазначено.
- Дозволити всім компонентам набору та зразкам досягнути кімнатної температури (22-28°C) та добре перемішати перед використанням.
- Не замінювати компоненти набору з різних лотів. Дивитися термін придатності, який надрукований на етикетках упаковки або на флаконах. Не використовувати компоненти набору у яких закінчився термін придатності.
- Якщо ви використовуєте автоматичне обладнання, користувач несе відповідальність за те, що набір був протестований належним чином.
- Неповне або неточне видалення рідини з лунок може вплинути на точність аналізу та / або збільшити фон. Для того, щоб збільшити продуктивність набору на автоматичних системах, рекомендується збільшити кількість промивань.

- Важливо, щоб час реакції в кожній лунці був незмінним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно тривати більше десяти хвилин, щоб уникнути збоїв в аналізі. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуйтесь того ж порядку видачі. Якщо використовуються більше ніж планшет, рекомендується повторити криву реакції на дозу в кожному планшеті.
- Додавання розчину субстрату ТМБ ініціює кінетичну реакцію, яка закінчується після додавання стоп-розчину. Таким чином, ТМБ субстрат та Стоп-розчин потрібно додавати в однаковій послідовності, щоб усунути будь-які відхилення в часі під час реакції.
- Дотримуйтесь вказівок щодо здійснення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу зразків контролів.
- Максимальна точність потрібна для відновлення та дозування реагентів.
- Зчитувачі планшетів вимірюють вертикально. Не торкатися нижньої частини пробірок.

6 ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ

Зберігати набір при температурі від 2 °С до 8 °С; набір є стабільним до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці набору та в сертифікаті аналізу. Не використовуйте набір або його компоненти після закінчення терміну придатності.

7 ПРОЦЕДУРА

7.1 Підготовка стандартів та контролів

Перед використанням, перемішувати протягом 5 хвилин ротаційним змішувачем.

Стандарти готові до використання та мають наступні концентрації Кортизолу:

	S0	S1	S2	S3	S4
нг/мл	0	1	5	30	200

Контролі готові до використання.

Після відкриття стандарти та контролі стабільні протягом 6 місяців при температурі 2° - 8°С.

7.2 Підготовка кон'югату

Кон'югат готовий до використання.

Після відкриття кон'югат стабільний протягом 6 місяців при температурі 2° - 8°С.

7.3 Підготовка зразка

Визначення Кортизолу за допомогою цього набору слід проводити в зразках сечі.

Важлива примітка: Набір розроблений для використання на необроблених зразках сечі; підкислення сечі, що призводять рН до значень нижче 5.0, можуть перешкоджати аналізу та давати відхилені результати.

Необов'язково розбавляти зразок.

Загальний обсяг виділеної сечі протягом 24 годин слід зібрати і змішати в одному контейнері. Зразки сечі, які не підлягають негайному аналізу, слід тривалий час зберігати при температурі від 2 °С до 8 °С або при -20 °С (максимум 6 місяців).

Зразки з концентрацією більше 200 нг/мл не слід розводити; такі зразки потрібно позначати як "> 200 нг/мл".

7.4 Підготовка Промивного розчину

Перед використанням розведіть вміст кожного флакону 10X концентрату «Промивного розчину» дистильованою водою до кінцевого об'єму 500 мл. Для менших обсягів дотримуйтесь коефіцієнту розведення 1:10. Розведений промивний розчин стабільний протягом 30 днів при температурі від 2 °С до 8 °С.

У концентрованому промивному розчині можна спостерігати присутність кристалів; в цьому випадку перемішують при кімнатній температурі до повного розчинення кристалів; для більшої точності розведіть всю пляшку концентрованого промивного розчину до 500 мл, дбаючи про повне перенесення кристалів, потім перемішайте до повного розчинення кристалів.

7.5 Процедура

Доведіть усі реагенти до кімнатної температури (22 - 28°С) щонайменше протягом 30 хвилин.

Невикористані покриті мікролункові смужки слід надійно вивільнити з пакету з фольги, що містить осушувач, і зберігати при температурі від 2 °С до

8 °С.

Щоб уникнути можливого мікробного та/або хімічного забруднення, невикористані реактиви ніколи не слід переносити в оригінальні флакони. Оскільки для покращення точності результатів тестувань необхідно проводити визначення у двох примірниках, підготуйте дві лунки для кожної точки калібрувальної кривої (S0-S4), дві для кожного Контролю, дві для кожного зразка, одну для Бланку.

Реагент	Стандарти	Зразок / контроль	Бланк
Стандарт S0-S4	10 мкл		
Зразок/контроль		10 мкл	
Кон'югат	300 мкл	300 мкл	
Інкубувати при температурі 37°С протягом 1 години. Видалити вміст з кожної лунки; промити лунки 3 рази з 350 мкл розведеного миючого розчину. Важливо: під час кожного етапу промивання, обережно струшуйте планшет протягом 5 секунд та видаліть залишки розчину перевернувши його на абсорбуючий паперовий рушник. Автоматичний вошер: якщо ви використовуєте автоматичне обладнання, мийте лунки щонайменше 6 разів.			
Розчин субстрату	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубувати при кімнатній температурі 22 - 28°С протягом 15 хвилин у темряві.			
Стоп-розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Обережно потрусіть мікропланшет. Зчитайте абсорбцію (E) при 450 нм відносно референсної довжини хвилі 620-630нм або відносно Бланку протягом 5 хвилин.			

8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контролі при нормальному, високому та низькому рівнях діапазону Кортизолу (у сечі) для моніторингу процедури аналізу. Ці контролі слід розглядати як невідомі, а значення будуть визначені у кожній проведеній процедурі тесту. Таблиці контролів якості слід вести для того, щоб слідкувати за продуктивністю реагентів, що постачаються. Для встановлення тенденцій слід використовувати відповідні статистичні методи. Кожна лабораторія повинна встановити допустимі межі ефективності аналізу. Інші параметри, які потрібно моніторити, включають точки перетину 80, 50 та 20% стандартної кривої для перебігу відтворюваності. Крім того, максимальна абсорбція повинна відповідати минулому досвіду. Значне відхилення від встановлених показників може вказувати на непомітні зміни експериментальних умов або деградацію наборів реагентів. Для визначення причини виникнення змін слід використовувати свіжі реагенти.

9 РЕЗУЛЬТАТИ

9.1 Середнє значення абсорбції

Обчисліть середнє значення абсорбції (Em) для кожної точки стандартної кривої та кожного зразка.

9.2 Стандартна крива

Визначіть середнє значення абсорбції (Em) Стандартів (S0-S4) відносно концентрації. Проведіть криву через визначені точки. (Hanp. Four Parameter Logistic).

9.3 Обчислення результатів

Інтерполюйте значення зразків на стандартній кривій, щоб отримати відповідні значення концентрацій, виражених у нг/мл.

Щоб обчислити концентрацію кортизолу у сечі, обчисліть, як описано вище, і виправте загальний об'єм сечі, зібраної за 24 години:

$$\text{нг/мл} \times \text{об'єм (мл) сечі 24 год} / 1000 = \text{мкг кортизолу/24 год}$$

10 РЕФЕРЕНСНІ ЗНАЧЕННЯ

Щоб визначити діапазон норм для зразків сечі, протестували 128 здорових дорослих чоловіків та жінок.

Результат:

Діапазон норм сечі (24 год)
1.5 мкг/24год – 63 мкг/24год

11 ПРОДУКТИВНІСТЬ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ

11.1 Аналітична чутливість

Аналітичну чутливість досліджували за допомогою LOB (біла межа), LOD

(межа виявлення), LOQ (межа кількісної оцінки) та анальної чутливості (A.S.). У наведеній нижче таблиці наведені критерії дослідження та отримані результати.

	Критерії	Результати (нг/мл)
LOB	60 повторів Cal 0, які використовуються як "Бланк", були досліджені протягом 5 різних сеансів протягом 3 днів	0.28
LOD	6 зразків сечі з низькою концентрацією кортизолу були досліджені протягом 10 аналізів у двох повторах, проведених за 5 днів	0.47
LOQ	6 зразків сечі з низькою концентрацією кортизолу були досліджені протягом 10 аналізів у двох повторах, проведених протягом 5 днів	0.56
A.S.	Було проведено аналіз 20 повторів Cal 0 і 5 повторів Cal 1. A.C. була розрахована методом лінійної регресії	0.22

11.2 Точність та відтворюваність (комплекс точності)

Точність та відтворюваність оцінювали за допомогою 6 різних зразків сечі з різною концентрацією Кортизолу.

У наведеній нижче таблиці показано % у межах пробігу та загальний КВ.

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	У межах пробігу КВ%	Загальний КВ%
PS2	20	112.141	6.6%	12%
PS4	20	64.563	8.1%	12%
СТ високий	20	50.577	7.3%	11%
PS5	20	25.878	7.6%	10%
PS6	20	9.269	7.6%	11%
СТ низький	20	3.438	7.0%	9%

11.3 Аналітична специфічність

11.3.1 Інтерферуючі речовини

Вплив на альбумін, ацетилсаліцилову кислоту, ібупрофен та аскорбінову кислоту вивчали шляхом додавання інтерферуючих речовини до зразка сечі з низькою та високою концентрацією кортизолу, а також шляхом порівняння його концентрації з неспайковим зразком.

Інтерференцію оцінювали як "значну", якщо вона викликала зміщення концентрації > 10% між спайк-зразком та неспайк-зразком.

Наступна таблиця показує отримані результати:

Речовина	Концентрація	Інтерференція
Альбумін	5 мг/дл	Нема
Ацетилсаліцилова кислота	3.62 ммоль/л	Нема
Ібупрофен	2.42 ммоль/л	Нема
Аскорбінова кислота	5 мг/л	нема

Висновок: не знайдено жодної інтерференції до Альбуміну, Ацетилсаліцилової кислоти, Ібупрофену та Аскорбінової кислоти.

11.3.2 Перехресна реактивність

Перехресну реакцію антитіла обчислювали при 50% відповідно до Авраама, показана у таблиці:

Реагент	Перехресна реактивність	Реагент	Перехресна реактивність%
Кортизол	100%	Тестостерон	<0.1%
Преднізолон	46.2%	Спіронолактон	<0.1%
11-Деоксикортизол	4%	ДГЕА	<0.1%
Кортизон	3.69%	ДГЕАС	<0.1%
Преднізон	3.10%	Андростенедіон	<0.1%
11альфаОН	1%	Андростерон	<0.1%
Прогестерон	<0.1%	ДГТ	<0.1%
Прогестерон	<0.1%	Даназол	<0.1%
Альдостерон	<0.1%	Холестерин	<0.1%
Прегненолон	<0.1%	Дексаметазон	<0.1%
17бета Естрадіол	<0.1%		
Естрон 3-сульфато	<0.1%		
Естріол	<0.1%		

11.4 Кореляція

137 зразків сечі були протестовані за допомогою набору ІФА для визначення

кортизолу в сечі (EIA-2989) та методу LC-MS (посилання).

Крива лінійної регресії становить:

$$y = 1.008x - 0.5019$$

$$r^2 = 0.83$$

12 ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Реагенти слід утилізувати відповідно до місцевих вимог.



ВИРОБНИК

DRG Інструментс ГмБХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

