

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРТИЗОЛА

3625-300, Cortisol Test System

Каталог. № : 3625-300

Методика от 03-20-2012

Количество : 96

Версия 3

Производитель: Monobind (США)



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

1.0 ВВЕДЕНИЕ

Назначение: количественное определение концентрации Общего Кортизола в человеческой сыворотке или плазме.

2.0 ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Кортизол является наиболее мощным глюкокортикоидом, вырабатываемым корой надпочечников человека. Каки другие стероиды надпочечников, он синтезируется из холестерина, проходя серию ферментативно опосредованных шагов в коре надпочечников. Первым и лимитирующим шагом в стероидогенезе в коре надпочечников является превращение холестерина в прегненолон, которое стимулируется адренкортикотропным гормоном гипофиза, который, в свою очередь, регулируется гипоталамическим кортикотропин релизинг-фактором. Секреция АКТГ и КРГ ингибируется высокими уровнями кортизола. В плазме основное количество кортизола связано с высокоафинным кортикостероид-связывающим глобулином (КСГ, транскортин). Кроме физиологического противовоспалительного действия и поддержания кровяного давления, он также вовлечен в глюконеогенез. Кортизол действует через специфические внутриклеточные рецепторы в разных физиологических системах, включая иммунную функцию, регуляцию количества глюкозы, сосудистого тонуса, утилизацию субстрата и в костром метаболизме. Кортизол экскретируется с мочой в несвязанной (свободной) форме.

Продукция кортизола имеет АКТГ-зависимый суточный ритм с пиковыми значениями ранним утром и и спадом ночью. Факторы, контролируемые этот суточный ритм, до конца не известны. Суточный ритм секции АКТГ/кортизола устанавливается в раннем неонатальном периоде и может нарушаться при различных физических и психологических условиях. Более того, повышенные количества АКИГ и кортизола секретируются независимо от циркадного ритма в ответ на физический или психологический стресс.

Повышенные уровни кортизола выявляются у пациентов с болезнью Кушинга (гиперсекреция АКТГ), а так же у пациентов с опухолями надпочечников. Низкие уровни кортизола обнаруживаются при первичной надпочечниковой недостаточности (т.к. гипоплазия надпочечников, врожденная надпочечниковая гиперплазия, болезнь Аддисона) и дефицит АКТГ. В связи с суточными колебаниями уровня кортизола, определение нормальных и аномально низких уровней кортизола может быть затруднено. Таким образом, приходится использовать различные тесты для оси гипофиз-надпочечники (АКТГ-кортизол), включая инсулин-индуцированную гипогликемию, кратко- и долгосрочную стимуляцию АКТГ, стимуляцию кортикотропином, искусственная блокада синтеза кортизола метрономом. Характеристики ответа кортизола на каждый из тестов известны.

Данный набор использует специфические моноклональные антела к кортизолу и не требует предварительной экстракции образцов сыворотки и плазмы. Перекрестная реактивность с другими натуральными стероидами низкая.

Использование нескольких референсных сывороток с известными концентрациями кортизола позволяет построить график концентрации. Путем сравнения по дозозависимой кривой определяется концентрация неизвестных образцов.

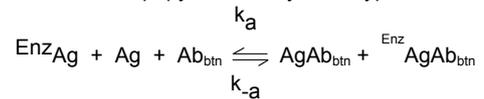
3.0 ПРИНЦИП МЕТОДА

Конкурентный иммуноанализ (тип 7):

Настоящие реагенты, требующиеся для твердофазного иммуоферментного анализа, включают антитела, конъюгат фермента с антигеном и нативный антиген. При смешивании биотинилированных антител, конъюгата фермент-антиген и нативного антигена, содержащегося в сыворотке, происходит конкуренция между нативным антигеном образца и конъюгатом

фермент-антиген за ограниченное число иммобилизованных сайтов связывания.

Взаимодействие иллюстрируется следующим уравнением:



Ab_{bnt} = биотинилированные антитела (постоянное количество)

Ag = нативный антиген (переменное количество)

EnzAg = конъюгат фермент-антиген (постоянное количество)

AgAb_{bnt} = комплекс антиген-антитело

$\text{EnzAgAb}_{\text{bnt}}$ = комплекс конъюгат - антитела

k_a = константа скорости ассоциации

k_{-a} = константа скорости диссоциации

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

Происходит реакция между биотином, связанным с антителами и стрептавидином, иммобилизованным в лунках микропланшета. Это позволяет отделить фракцию, связавшуюся с антителами, при декантировании или аспирации.

$\text{AgAb}_{\text{bnt}} + \text{EnzAgAb}_{\text{bnt}} + \text{стрептавидин}_{\text{cw}} \Rightarrow$ иммобилизованный комплекс

$\text{стрептавидин}_{\text{cw}}$ = стрептавидин, иммобилизованный в лунках

Иммобилизованный комплекс = «сэндвич» комплекс, связанный с твердой фазой (поверхностью лунок)

Активность фермента во фракции связанных антител обратно пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании нескольких стандартов с известным значением концентрации антигена строится калибровочная кривая, по которой вычисляется концентрация в образцах.

4.0 РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

- A. Калибраторы кортизола - 1 мл/флакон - значки A-F**
6 флаконов референсной сыворотки (стандартов) с концентрациями кортизола 0 (A), 1.0 (B), 4.0 (C), 10.0 (D), 20.0 (E) и 50.0 (F) мкг/дл. Хранить при 2-8°C. Содержат консерванты.
- B. Конъюгат фермент-кортизол - 1.0 мл/флакон - значок**
Один флакон, содержащий конъюгат кортизола (аналог) с пероксидазой хрена (HRP) в белковом стабилизирующем растворе, с зеленым красителем. Хранить при 2-8°C.
- C. Буфер Стероидного конъюгата - 7.0 мл/флакон - значок**
Один флакон, содержащий буфер, красный краситель, консерванты и ингибиторы связывающего белка. Хранить при 2-8°C.
- D. Биотинилированный кортизол, 7.0 мл/флакон, значок**
Один флакон, содержащий биотинилированные антитела к кортизолу, очищенные конъюгированные кроличьи IgG в буфере, желтый краситель, консервант. Хранить при 2-8°C.
- E. Планшет, покрытый стрептавидином, 96 ячеек, значок**
Один 96-луночный микропланшет, покрытый 1.0 мкг/мл стрептавидина и запаянный в алюминиевую фольгу с осушителем. Хранить при 2-8°C.
- F. Концентрат Буфера для промывок - 20 мл - значок**
Один флакон, содержащий ПАВ в фосфатном солевом буфере. Содержит консервант. Хранить при 2-30°C.
- G. Субстрат A - 7 мл/флакон - значок S^A**
Один флакон, содержащий ТМБ в буфере. Хранить при 2-8°C.
- H. Субстрат B - 7 мл/флакон - значок S^B**
Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C.
- I. Стоп-раствор -- 8.0 мл/флакон - значок**
Один флакон, содержащий сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.
- J. Инструкция к набору.**

Замечание 1: Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Замечание 2: Открытые реагенты стабильны 60 дней при хранении от 2 до 8°C.

Замечание 3: Перечисленные реагенты для одного 96-луночного микропланшета.

4.1 Необходимые, но не поставляемые с набором материалы

1. Микродозаторы на 25, 50 и 100 мкл с точностью не хуже 1.5%
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не хуже 1.5%
3. Диспенсеры переменного объема (200–1000 мкл) для конъюгата
4. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутылка

5. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 нм и 620 нм.
6. Фильтровальная бумага для высушивания лунок
7. Пластиковая пленка или крышка для инкубации микропланшета.
8. Вакуумный аспиратор (опционально) для промывок
9. Таймер
10. Контрольные материалы

5.0 ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для диагностики *in vitro* Не для внутреннего или наружного использования на людях или животных

Потенциально опасный биоматериал. Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована методами, одобренными FDA, в которых получены отрицательные результаты на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, что рекомендуется для любых образцов крови согласно правилам квалифицированной лабораторной практики. Рекомендации смотрите в национальных руководствах по биобезопасности или, например, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

6.0 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцами служат сыворотка крови, плазма. Должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для сопоставимого сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка (натощак). Кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов. Для получения плазмы используйте пробирки с гепарином или ЭДТА. Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки используйте центрифугу.

Образцы могут храниться при 2-8 °C до 5 дней. Если образцы не могут быть проанализированы за это время, они могут быть заморожены до -20 °C на период до 30 дней. Избегайте повторных циклов замораживания - оттаивания. Для анализа в дублях требуется 0.020 мл образца.

7.0 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней, для отслеживания характеристик набора. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

8.0 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. **Рабочий раствор Ферментного конъюгата** – стабилен 1 год.
Отберите точно 0.7 мл конъюгата фермент-кортизол и внесите во флакон, содержащий буфер для разведения конъюгата кортизола. Хранить при 2-8°C.
2. **Буфер для промывок**
Разведите концентрат промывочного буфера в подходящем сосуде, до 1000 мл дистиллированной водой. Храните при комнатной температуре (2-30 °C) до 60 дней.
3. **Рабочий субстратный раствор**
Смешайте Субстраты, вылив содержимое коричневого флакона с Субстратом А во флакон Субстрат В. Закройте смесь желтой крышкой для легкой идентификации. Перемешайте смесь и подпишите флакон «Рабочий раствор субстрата». Раствор хранится при 2-8 °C.

Замечание: не используйте рабочий раствор субстрата, если он приобрел голубую окраску.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для постановки в дублях. **Верните неиспользуемые стрипы в алюминиевый пакет и закройте его. Храните при 2-8 °C.**
2. Добавьте по 0.025 мл (25 мкл) стандартов, контролей и исследуемых образцов в соответствующие лунки.
3. Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) рабочего раствора ферментного конъюгата в каждую лунку (см. раздел "Приготовление реагентов").

4. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
5. Добавьте по 0.050 мл (50 мкл) конъюгата биотин-кортизол в каждую лунку.
6. Хорошо перемешайте микропланшет в течение 20-30 секунд.
7. Накройте микропланшет пластиковой пленкой и инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
8. Удалите содержимое ячеек декантацией или аспирацией. Высушите планшет на фильтровальной бумаге, если использовалась декантация.
9. Добавьте 350 мкл буфера для промывок (см. раздел "Приготовление реагентов") и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте воздушных пузырьков).
10. Добавьте по 100 мкл Рабочего раствора субстрата в каждую лунку (см. "Приготовление реагентов"). **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**

НЕ ВСТРЯХИВАЙТЕ ПЛАНШЕТ ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ СУБСТРАТА

11. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
12. Остановите развитие окраски добавлением в каждую ячейку 50 мкл стоп-раствора и перемешайте ячейки в течение 15-20 секунд. **Всегда добавляйте реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных ячейках.**
13. Измерьте величины поглощения содержимого ячеек на длине волны 450 нм (измерение проводите при референсной длине волны 620-630 нм). Измерения должны быть проведены в течение 30 минут после добавления стоп-раствора.

Замечание: Образцы с концентрацией выше 50 мкг/дл необходимо развести, в 5 и/или в 10 раз, кортизолом «0 мкг/дл» сыворотки пациента.

10.0 РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения концентрации кортизола в неизвестных образцах используется калибровочная кривая.

1. Запишите значения оптической плотности для всех ячеек как показано в примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации кортизола в мкг/дл (не рассчитывайте среднего значения до построения).
3. Проведите оптимальную калибровочную кривую.
4. Определите концентрации кортизола в контролях и образцах, используя калибровочную кривую и средние значения оптической плотности для каждого образца. В приведенном ниже примере средняя абсорбция 1.071 пересекает стандартную кривую при 10.2 мкг/дл (см. рис. 1)

ПРИМЕР 1

Образец	Положение лунки	Абсорбция (A)	Среднее абсорбции (B)	Концентрация нг/мл
Калибратор А	A1	2.483	2.543	0
	B1	2.575		
Калибратор В	C1	2.150	2.194	1.0
	D1	2.186		
Калибратор С	E1	1.573	1.585	4.0
	F1	1.597		
Калибратор D	G1	1.103	1.084	10
	H1	1.065		
Калибратор E	A2	0.726	0.725	20
	B2	0.724		
Калибратор 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		
Образец	A3	1.056	1.071	10.24
	B3	1.086		

* Данные приведены в примере 1 только для иллюстрации и не должны использоваться для построения стандартной кривой.

Рисунок 1

(См. оригинал инструкции)

11.0 ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для успешного выполнения теста необходимо выполнение следующих условий:

1. Оптическая плотность Калибратора 0 мкг/дл ≥ 1.3
2. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

12.0 АНАЛИЗ РИСКА

MSDS и Форма Анализа Риска доступны по запросу от Monobind Inc.

12.1 Проведение анализа

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции поддерживалось постоянным в каждой ячейке.
2. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут.
3. Очень липемические, гемолизированные и сильно загрязненные образцы не должны использоваться.
4. Если используется больше, чем один планшет, рекомендуется повторять калибровочную кривую.
5. Добавление раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при добавлении стоп-раствора. Следовательно, добавление субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных ячейках.
6. Измерение оптической плотности на ридере проходит вертикально. Не прикасайтесь ко дну микроячеек.
7. Плохая промывка ячеек может приводить к невозможным результатам.
8. Использовать компоненты из одного набора. Не перемешивать реагенты из разных партий.
9. Аккуратное и точное пипетирование и соблюдение точного времени и температуры являются важными. Любое отклонение может привести к неточным результатам.
10. Для надлежащей работы устройства придерживаться всех установленных норм.
11. Важно провести калибровку всего оборудования, например, пипеток, считывающих устройств, моющих устройств и/или автоматизированных инструментов.
12. Анализ риска, как требуется Директивой 98/79/CE, для данного и других устройств, произведенных Monobind Inc., может быть запрошен у Monobind@Monobind.com.

12.2 Интерпретация

1. **Измерения и интерпретация результатов должны проводиться опытным специалистом.**
2. Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для определения диагноза. Особенно если результаты противоречат другим данным анализов.
3. Для действительных результатов соответствующие контрольные и другие параметры должны находиться в установленных нормах.
4. **Производитель не несет ответственности** за результаты, если смешиваются составляющие из разных наборов.
5. Если используются контрольные данные компьютера для интерпретации результатов, ожидаемые значения калибраторов должны быть в пределах 10 % заданных концентраций.

13.0 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В соответствии с установленными референсными интервалами для "нормальной" взрослой популяции, ожидаемые значения при использовании данного метода приведены в таблице 1:

ТАБЛИЦА 1
Ожидаемые значения для кортизола, мкг/дл

Население	Утро	После обеда
Взрослые	5-23	3-13
Дети	3-21	3-10
Новорожденные	1-24	

Важно помнить, что установленный диапазон значений, который можно ожидать у данной популяции "нормальных" людей с использованием данного метода зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода в руках лаборанта. По этим причинам каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

14.1 Воспроизводимость

Воспроизводимость набора внутри серии и между сериями определялась в анализе пулов сывороток трех разных уровней. Число, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

ТАБЛИЦА 2
Воспроизводимость внутри серии (мкг/дл)

Образец	N	X	σ	C.V.
Низкий	16	3.4	0.28	8.2 %
Нормальный	16	14.2	0.91	6.4 %
Высокий	16	36.5	2.23	6.1 %

ТАБЛИЦА 3
Воспроизводимость между сериями (мкг/дл)

Образец	N	X	σ	C.V.
Низкий	10	3.1	0.30	9.7 %
Нормальный	10	15.1	1.06	7.0 %
Высокий	10	37.4	2.71	7.3 %

*Измерения проводились в 10 постановках в дублях в течение 10 дней.

14.2 Чувствительность

Чувствительность метода – 91.5 пг. Это эквивалентно образцу с концентрацией 0.366 мкг/дл для данного набора. Предел обнаружения определен статистически как концентрация, соответствующая значению оптической плотности нулевого стандарта (мкг/дл) плюс 2σ (σ - стандартное отклонение) при 95% доверительном интервале.

14.3 Точность

Настоящий метод сравнивался с референсным хемилюминесцентным методом. Использовались образцы с низким, средним и высоким содержанием кортизола (диапазон значений 0.4-95 мкг/дл). Общее число образцов было 202. Было выведено уравнение линейной регрессии и был рассчитан коэффициент корреляции для данного метода Testosterone EIA в сравнении с референсным методом. Полученные данные приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции
Этот метод	6.16	$Y = -0.228 + 1.0186(x)$	0.984
Метод сравнения	16.8		

Было найдено только незначительное расхождение данного метода и референс-метода, что доказывают близкие средние значения. Уравнение и коэффициент корреляции показывают прекрасную согласованность методов.

14.4 Специфичность

Перекрестные реакции антител к кортизолу с различными веществами оценивались добавлением влияющих веществ в сыворотку в различных концентрациях. Кросс-реактивность рассчитывалась как отношение между дозой влияющего вещества и дозой кортизола, требуемого для замещения этого количества вещества.

Вещество	Перекрестная реактивность
Кортизол	1.0000
Андростенедион	0.0004
Кортизон	0.2300
Кортикостерон	0.1800
11-Деоксикортизол	0.0550
Дексаметазон	0.0001
Прогестерон	0.0002
17 α -ОН Прогестерон	н/о
DHEA	н/о
Эстрадиол	н/о
Эстрон	н/о
Даназол	н/о
Тестостерон	н/о



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»