



## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ ПРЯМОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО КОРТИЗОЛА В МОЧЕ

Кат. № : DKO018  
Кол-во тестов : 96  
Производитель : DiaMetra (Италия)

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

Методика от 03-2012

Для рутинных исследований

### НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения свободного кортизола в моче. Набор предназначен только для лабораторного использования.

### 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Кортизол – это стероидный гормон, секретируемый корой надпочечника в ответ на гормон АКТГ (продуцируемый гипофизом). Он участвует в ответе на стресс, повышает кровяное давление, уровень сахара в крови, может вызывать бесплодие у женщин и подавлять иммунную систему.

Кортизол действует через специфические внутриклеточные рецепторы и влияет на многие физиологические процессы, включая функцию иммунной системы, регуляцию уровня глюкозы сосудистой тонус, утилизацию субстрата и костный метаболизм. Большая часть кортизол экскретируется с мочой, в несвязанной (свободной) форме.

В плазме кортизол связан с кортикостероид-связывающим глобулином (СВГ, транскотин), с высокой аффинностью, и альбумином. Для большинства рецепторов доступен только свободный кортизол.

Эти нормальные эндогенные функции лежат в основе физиологических последствий хронического стресса – продолжительная секреция кортизола приводит к потере мышечной массы, гиперглюкемии и подавлению иммунного/воспалительного ответов. К тем же последствиям приводит длительный прием глюкокортикоидов.

Фракция свободного кортизола представляет собой метаболически активный кортизол. В норме менее 1% экскретируется с мочой. При патологии (например, синдром Кушинга) уровень свободного кортизола в моче повышен, так как СВГ не связывает избыточный кортизол плазмы, и он удаляется с мочой.

Во время беременности или терапии препаратами эстро-прогестогена повышение кортизола в плазме связано с увеличением продукции транспортного белка, но уровень свободного кортизола в моче остается в норме, указывая на правильное функционирование. Данный тест очень полезен для оценки ренальной функции, так как он определяет свободный кортизол – т.е. метаболически активную форму. Кроме того, измерение свободного кортизола в моче является одним из лучших тестов для диагностики синдрома Кушинга.

### 2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Свободный кортизол (антиген), присутствующий в образцах, конкурирует с кортизолом, конъюгированным с пероксидазой хрена (конъюгат фермент-антиген), за связывание с ограниченным количеством антител к кортизолу, сорбированных в лунках микропланшета (твердая фаза). После инкубации из лунок удаляют не связавшиеся компоненты. Затем в лунки вносят ферментный субстрат ( $H_2O_2$ ) и субстрат ТМВ (ТМВ). После соответствующей инкубации, необходимой для развития окрашивания, энзиматическую реакцию останавливают и определяют абсорбцию в лунках.

Концентрацию свободного кортизола в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации свободного кортизола в образцах.

### 3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

#### 3.1 Реагенты, поставляемые в наборе

	Кат. №:
1. Калибраторы кортизола (5 флаконов, 1 мл каждый)	
CAL 0	DCE002/1806-0
CAL 1	DCE002/1807-0
CAL 2	DCE002/1808-0
CAL 3	DCE002/1809-0
CAL 4	DCE002/1810-0
2. Инкубационный буфер (1 флакон, 100 мл) Фосфатный буфер 50 мМ pH 7.4: ВСА 1 г/л	DCE001-0
3. Конъюгат (1 флакон, 1 мл) Кортизол, конъюгированный с пероксидазой хрена (HPR)	DCE002/1802-0
4. Насыщенный микропланшет (1 разделяемый микропланшет) Антитело к анти кортизолу, нанесенное на пластину	DCE002/1803-0
5. ТМВ Субстрат (1 флакон, 15 мл) $H_2O_2$ -ТМВ 0.26 г/л (избегать контакта с кожей)	DCE004-0
6. Стоп раствор (1 флакон, 15 мл) Серная кислота 0.15 моль/л (избегать контакта с кожей)	DCE005-0
7. Низкий контроль (1 флакон, 1 мл) Готов к использованию	DCE045/1801-0
8. Высокий контроль (1 флакон, 1 мл) Готов к использованию	DCE045/1802-0

#### 3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором

Дистиллированная вода

#### 3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.

Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

#### Замечания:

Храните все реагенты при +2... +8°C в темноте.  
Открывайте пакет с компонентом 4 (ПОКРЫТЫЙ МИКРОПЛАНШЕТ) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования.  
Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.

### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Набор предназначен для использования в in-Vitro диагностике. Не для внутреннего или внешнего использования на людях или животных.
- Использовать соответствующую защитную одежду при работе с реагентами.
- Соблюдать установленные нормы при работе с продуктами кровяного происхождения.
- Реагенты содержат Проклин 300 в качестве консерванта.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМВ/  $H_2O_2$  с металлами или оксидантами.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не используйте реагентов из разных лотов.
- Не используйте сильно гемолизированные образцы.
- Данный метод позволяет проводить измерения свободного кортизола в диапазоне от 10 нг/мл до 500 нг/мл.
- Клиническая значимость определения свободного кортизола может быть снижена, если пациент получает кортикостероиды или натуральные или синтетические стероиды.

### 5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Строго придерживаться временных шагов при пипетировании.
- Реагенты хранить охлажденными при 2-8 °C в оригинальной упаковке. Реагенты стабильны до окончания срока годности при соблюдении правил хранения и обращения с ними.
- Привести все компоненты и образцы к комнатной температуре (22-28 °C) перед использованием.
- Не смешивать содержимое из разных наборов. Не использовать после истечения срока годности.
- При использовании автоматического оборудования, убедиться в надежности тестирования оборудования.

- Неполное или не аккуратное удаление жидкости из лунок может повлиять на точность результатов.
- Время реакции в каждой лунке должно быть постоянным. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут. Если требуется больше 10 минут, соблюдайте тот же порядок пипетирования. Если используется больше 1 планшета, рекомендуется повторить кривую для каждого планшета.
- Добавление ТМБ раствора инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому ТМБ раствор и стоп раствор должны добавляться с одинаковыми интервалами.
- Соблюдать правила, установленные лабораторией, при работе с контролями и сывороткой.
- Максимальная точность необходима для восстановления и распределения реагентов.
- Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией.
- Измерения проводить вертикально. Не трогать дно лунок.

## 6. ПРОЦЕДУРА

### 6.1. Подготовка калибраторов (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

В наборе поставляются стандарты со следующими концентрациями свободного кортизола:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
нг/мл	0	10,0	50,0	150,0	500,0

Стабильность: после вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при 2-8 °С.

### 6.2. Подготовка разбавленного конъюгата

Готовьте непосредственно перед использованием.

Внесите 10 мкл конъюгата (реагент 3) в 1.0 мл инкубационного буфера (реагент 2). Тщательно перемешайте в течение минимум 10 минут. Готовый раствор стабилен 3 часа при комнатной температуре.

### 6.3. Подготовка образцов

**Разведите образцы мочи (1:2) инкубационным буфером** (например, 100 мкл + 100 мкл).

Необходимо собрать суточную мочу в один контейнер, тщательно перемешать. Образцы мочи, которые не будут протестированы сразу, должны храниться при 2 ÷ 8°С или при – 20°С, если срок хранения превышает одну неделю.

Контроли готовы к использованию, не требуют разведения.

### 6.4. Процедура

- **Привести все реагенты к комнатной температуре (22-28 °С).**
- Неиспользуемые микропланшетные полоски хранить тщательно упакованными при 2-8 °С с осушителем.
- Во избежание микробного и/или химического загрязнения неиспользуемые реагенты не возвращать в оригинальные флаконы.
- Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из калибраторов (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

	Стандарт/контроль	Образец	Бланк
Калибраторы C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	10 мкл		
Разведенные образцы/контроли		10 мкл	
Разбавленный конъюгат	300 мкл	300 мкл	
Инкубируйте при 37°С в течение 1 часа. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки дистиллированной водой 2 раза, по 400 мкл на лунку. Повторите процедуру промывки, полностью удалив воду из лунок.			
Субстрат ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22±28°С в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Считайте абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка в течение 5 минут.			

## 7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями свободного кортизола для контроля качества выполняемых исследований. Все

контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградацию реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

## 8. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (Em) для каждой точки калибровочной кривой (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) и для каждого образца.

### 8.2. Калибровочная кривая

Отложите средние значения абсорбции стандартов (Em) против соответствующих концентраций. Проведите оптимальную кривую через полученные точки (например, 4х параметрическая регрессия).

### 8.3. Расчет результатов

Значения концентрации аналита в исследуемых образцах получите интерполяцией соответствующих средних значений абсорбции образцов из калибровочной кривой, в нг/мл.

**Для расчета концентрации кортизола в моче, полученное из калибровочной кривой значение скорректируйте по общему объему собранной суточной мочи:**

**нг/мл x объем (мл) мочи 24 ч / 1.000 = мкг кортизола /24 ч**

## 9. КОНТРОЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Концентрация кортизола в моче в течение 24 часов должна находиться в следующем диапазоне:

50 – 190 мкг/24 часа
----------------------

## 10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 10.1. Воспроизводимость

#### 10.1.1. Воспроизводимость внутри серии

Воспроизводимость внутри серии определяли тестированием 10 повторов трёх различных контрольных сывороток в одной постановке. Воспроизводимость внутри серии составила ≤7%.

#### 10.1.2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями определяли повторным 10х тестированием трех различных контрольных сывороток наборами двух различных лотов. Воспроизводимость между сериями составила ≤9%.

### 10.2. Извлечение

Извлечение 25- 50 – 100 – 200 нг/мл кортизола в моче, добавленного в образцы составило в среднем (±SD) 101.89% ± 4.55% по сравнению с исходной концентрацией.

### 10.3. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация свободного кортизола, отличная от нулевого стандарта, составляет 2.0 нг/мл при 95 % доверительном интервале.

### 10.4. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

Кортизол	100%
Кортизон	10.8%
11-α-дезоксикортизол	18.7%
Кортикостерон	2.4%
Прогестерон	0.1%
Альдостерон	1x10 <sup>-2</sup> %
11-α ОН прогестерон	1x10 <sup>-2</sup> %
Холестерин	< 1x10 <sup>-6</sup> %

#### 10.5. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra свободный кортизол (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения свободного кортизола. Образцы сывороток 23 женщин и 27 мужчин были проанализированы обоими методами, согласно протоколам. Была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 1.10 x - 1.56$$

$$r^2 = 0.949$$

y = кортизол мочи Diametra

x = кортизол Immunotech RIA

#### 11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### **ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

ООО «ДИАМЕБ»

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул.Черновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 612

e-mail: [www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

[www.biotechlab-s.com.ua](http://www.biotechlab-s.com.ua)