



Набір для визначення КОРТИЗОЛУ в СЛИНІ

Кат. № : EIA-2930
Кількість : 96
Виробник : DRG (Німеччина)

Увага: основою для проведення аналізу є оригінал інструкції англійською мовою.

Методика від 09-2006
Версія 4.0

ВСТУП

Кортизол (гидрокортизон, складовий F) є основним кортикостероїдом, який виробляється наднирковими залозами людини. Цей стероїдний гормон, молекулярна маса якого складає 363,5.

Коли рівень вільного (не зв'язаного з білками) кортизолу в крові підвищується, звільнення АСТН гальмується негативним зворотнім ефектом. І навпаки, якщо рівень кортизолу є субнормальним, негативний зворотній зв'язок зменшується, рівень АСТН зростає і адренальні залози секретують кортизол доти, поки нормальний рівень в крові не відновиться.

Звільнення АСТН є під контролем гіпоталамічного кортикотрофінолізину гормону (CRH); система негативного зворотнього зв'язку, включаючи кортизол, наявна в двох гіпоталамічних і гітуітарних рівнях.

Зазвичай, на протязі дня, коливання кортизолу досягає найвищого рівня зранку і найнижчого вночі. Корисну інформацію можна отримати тоді, коли виміри кортизолу будуть зроблені в фіксований час (наприклад, 8 год. ранку).

Основними біологічними ефектами кортизолу є: підвищення глюконеогенезису; відкладення глікогену в печінці; збільшення в крові концентрації глюкози, коли використання карбогідрату завершено; діє також на жировий метаболізм; а також протизапальна дія.

Вимір кортизолу є важливим для оцінки підозри порушення у глюкостероїдній продукції: синдром Кушинга (гіперкортизолізм), хвороби Едісона або вторинної адреналінової недостатності (гіпокортизолізм).

В багатьох випадках необхідним є проведення активного тесту (пригнічення або стимуляція), щоб обмежити недолік одного з трьох основних рівнів (наприклад, адренального, гітуітарного і гіпоталамічного).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір є соліднофазним ферментнозв'язаним імуносорбентним набором, створеним за принципом конкуренції. Лунки на мікропланшетці покриті моноклональним антитілом проти антигенів молекули кортизолу.

Проба сироватки пацієнта з ендogenous кортизолом інкубується у лунці разом з ензимним кон'югатом. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається водою. Кількість зв'язаної пероксидази зворотно пропорційна концентрації кортизолу в зразку. Після додавання субстрату інтенсивність утвореного забарвлення зворотно пропорційна концентрації кортизолу в зразку пацієнта.

ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in vitro".
2. Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, проби і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
3. Уникайте контакту з Стоп-розчином (0,5 М H₂SO₄). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
4. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і проб зі шкірою і слизовими.
5. Не їжте, не пийте і не курите в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
6. .Одягайте рукавиці при роботі з пробами і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати фальшиві результати.
7. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
8. Не використовуйте реагенти після закінчення дати придатності.

9. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
10. Не змішуйте реагенти різних лотів і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
11. Хімікалії і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.

КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

1. **Мікропланшетка з лунками:** 1шт. 96 лунок, покритих (мишиним) анти-кортизол-антисироваткою.
2. **Контрольний набір стандартів**, 7 фл., 1,0 мл кожен, готові до використання 0,0, 2, 5, 10, 20, 40, 80 нг/мл.
3. **Ензимний кон'югат**, 1 фл. 26 мл. Кортизол кон'югований з пероксидазою хрому, готовий до використання.
4. **Розчин Субстрату** - ТМВ, 1 фл., 25 мл. Готовий до використання.
5. **Стоп-розчин** - 0,5 М H₂SO₄, 1 фл., 14 мл. Готовий до використання.
6. **Миючий розчин** – 1 фл., 30 мл (концентрований до 1200 мл) .

МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Калібрований EIA рідер (450 nm±10 nm).
2. Калібровані мікро піпетки (100 та 200 мкл).
3. Дистильована вода або деонізована.
4. Таймер (60 хв.)
5. Резервуар для відходів.
6. Пробірки та штатив.
7. Міліметровий папір або відповідне програмне забезпечення для обробки даних.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Приведіть всі реагенти і необхідні стріпи до кімнатної температури.

Миючий розчин

Розведіть 40х концентрований миючий розчин (6) деонізованою водою до кінцевого об'єму 1200 мл. *Розбавлений миючий розчин стабільний 2 тижні при кімнатній температурі.*

ЗБЕРІГАННЯ

- При зберіганні при температурі 2-8⁰С активність реагентів буде збережена до дати виходу терміну. Не використовуйте після цієї дати.
- Всі відкриті реагенти необхідно зберігати при 2-8⁰ С. Планшетка з лунками повинна зберігатись при 2-8⁰С. Після відкриття ящика треба знову його щільно закрити.

ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ПРОБ

Забір проб слини потрібно здійснювати ТІЛЬКИ за допомогою спеціальних засобів для забору слини як SALI-TUBES 100 (SLV-4158) Salivette (Sarstedt cat. # 51.1534).

Виділення слини можна здійснювати на кусочок парафілму. Рекоменується перед аналізом заморозувати слину до -20⁰С. Після розмороження слину потрібно розмішати та центрифугувати впродовж 10 хв. Про 2000-3000 об./хв..

Проби слини необхідно зберігати при 2-8⁰ С до одного тижня, при довшому зберіганні потрібно їх заморозувати до -20⁰С. Повторення процесів заморожування/розморожування є неважливим.

ПРИМІТКА: проби, які містять азид натрію не повинні використовуватись в аналізі.

Потрібно уникнути вживання їжі, пиття, жування гімки або чищення зубів за 30 хв. до забору проб. В протилежному випадку, рекомендується ретельно промити рот холодною водою за 5 хв до забору проб. Не здійснювати забір у випадку захворювань ротової порожнини, запалення або пошкодження тканин (зараження крові).

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Загальні зауваження

1. Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
2. Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.
3. Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
4. Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком тесту необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені

і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.

- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

- Закріпіть необхідну кількість смужок в тримачі;
 - Додайте **100 мкл** кожного із Стандартів Кортизолу (2) у відповідні лунки;
 - Додайте у вибрану лунку **100 мкл** кожної проби;
 - Додайте **200 мкл** Кон'югату (3) до кожної проби та стандарту і добре змішуйте впродовж 10 секунд.
 - Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі.
 - Різно вилийте вміст лунок; Промийте лунки 3 рази М'яким розчином (400 мкл на лунку); Промокніть лунки на промокальному папері, щоб видалити залишки;
- Важливе зауваження:**
Чутливість і точність цього аналізу залежить від правильності проведення процедури промивання.
- Додайте **200 мкл** Субстрату (4) в кожну лунку;
 - Інкубуйте **30 хвилин** при кімнатній температурі;
 - Зупиніть реакцію додаванням в кожну лунку **100 мкл** стоп-розчину;
 - Зчитайте дані на фотометрі при **450±10 нм** протягом **10 хвилин** після додавання стоп розчину.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролі згідно державним і федеральним правилам. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні межі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

ВИРАХУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

- Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
- Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі.
- Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
- Автоматичні дані, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.
- Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, чим концентрація найвищого стандарту необхідно розбавити. При вичисленні концентрації цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

Типовий приклад стандартної кривої:

Стандарт	нг/мл	Одиниці абсорбції (450 нм)
Стандарт 0	0	1,88
Стандарт 1	2	1,75
Стандарт 2	5	1,58
Стандарт 3	10	1,39
Стандарт 4	20	1,09
Стандарт 5	40	0,75
Стандарт 6	80	0,47

ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Виходячи з досліджень 109 проб слини дорослих чоловіків і жінок різного віку показали, що кількість Кортизолу в слині знаходяться в межах 0,12 – 1,47 мкг/дл або 1,2 – 14,7 нг/мл.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

Чутливість

Найнижчий рівень Кортизолу, що можна виявити із нульового Стандарту становить 0,537 нг/мл або 0,0537 мкг/дл при 95% рівні чутливості.

Специфічність Стероїд

Перехресна реактивність

Кортизол	100,0%
Кортикостерон	29,0%
Корти сон	3,00
11-Деоксикортизол	< 1,00%
17-ОН Прогестерон	< 0,50%
Преднісон	< 0,10%
Прогестерон	< 0,10%
Дексаметазон	< 0,10%
Дезоксикортикостерон	< 0,10%
Дегідроепіандростерон сульфат	< 0,10%
Ест радіол	< 0,10%
Естріол	< 0,10%
Естрон	< 0,10%
Тестостерон	< 0,10%

Репродуктивність

Всередині аналізу

Середнє (нг/мл)	4.52	0.94	12.79	17.50
ОП (нг/мл)	0.120	0.042	0.230	0.258
КВ (%)	2.65	4.52	1.80	1.47
n =	20	20	20	20

Між аналізами

Середнє (нг/мл)	24,29	40,85
ОП (нг/мл)	1,81	2,38
КВ (%)	7,47	5,82
n =	12	12

Між партіями

Середнє (нг/мл)	1,22	12,65	15,81	4,16	4,53
ОП (нг/мл)	0,07	0,35	0,70	0,10	0,12
КВ (%)	5,97	2,73	4,43	2,35	2,72
n =	9	9	9	9	9

Відтворюваність

Проба	Ендогенний Кортизол (нг/мл)	Вимір. середн. ОЩ* в дуплеті (450 нм)	Вимір. кон-ція Кортизолу (нг/мл)	Очікувана кон-ція (нг/мл)	Відтворюваність %
<i>Див. показники відтворюваності в таблиці в оригіналі інструкції на англ. мові; стор. 7.</i>					

*ОЩ – оптична щільність при зчитуванні рідером.

Лінійність

	Проба 1	Проба 2	Проба 3
Концентрат (нг/мл)	33,13	80,0	23,23
Середн. % відтворюваності	107,0	99,1	97,5
Діапазон відтворюваності в % від-до	101,1 114,0	97,8 99,6	92,4 104,4

Інформація для замовлення:

ПМП "ДІАМЕБ"
вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005
Тел.: (0342) 775122; Факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com