



Набір для визначення КОРТИЗОЛУ Cortisol ELISA KIT

Кат. № : 118-1887
Кількість : 96
Виробник : DRG (USA)

Увага: основою для проведення аналізу є оригінал інструкції на англійській мові.

Методика від 08/06
Версія 10.0

ВСТУП

Кортизол (гідрокортизон, складовий F) є основним кортикостероїдом, який секретується в людині адренальними залозами. Цей стероїдний гормон, молекулярна маса якого складає 363.5.

Між продуктами людських адренальних залоз тільки кортизол є залученим в регулюванні секреції АСТН.

Коли рівень вільного (не зв'язаного з білками) кортизолу в крові підвищується, звільнення АСТН гальмується негативним зворотним 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 кортикотрофін-релізінг гормону (CRH); система негативного зворотного зв'язку, включаючи кортизол, наявна в двох гіпоталамічних і пітуїтарних 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, пітуїтарного і гіпоталамічного).

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір є соліднофазним ферментнозв'язаним імуносорбційним набором, створеним по принципу конкуренції. Лунки на мікропланшетці покриті моноклональним антитілом проти антигенів молекули кортизолу.

Зразок 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. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Лист Даних Безпеки Матеріалів.
3. 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, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
4. Уникайте контакту з Стоп-розчином (0,5 М H₂SO₄). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
5. Не піпайте реактиви ротом і уникайте контакту реактивів і зразків з шкірою і слизовими.
6. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реактиви.
7. .Одягайте рукавиці при роботі зі зразками і реактивами. Мікробіологічне забруднення реактивів чи зразків може дати фальшиві результати.
8. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
9. Не використовуйте реактиви після закінчення дати придатності.
10. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
11. Не змішуйте реактиви різних лотів і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
12. Хімікалії і приготвлені чи використані реактиви повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.

КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

1. **Мікропланшетка з лунками:** 1шт. 96 лунок, покритих анти-кортизол-моноклональним антитілом.
2. **Набір стандартів,** 7 фл., 1,0 мл, готові до використання. 0, 20, 50, 100, 200, 400, 800 нг/мл, що відповідає 0, 55,2, 138, 276, 552, 1104, 2208 нмоль/л. *Фактор конверсії 1 нг/мл=2,76 нмоль/мл*
3. **Ензимний кон'югат,** 1 фл. 25 мл. Анти-кортизол-сироватка, кон'югована з пероксидазою хрому, готова до використання.
4. **Розчин Субстрату - TMB,** 1 фл., 14 мл. Готовий до використання.

5. **Стоп-розчин - 0,5 М H₂SO₄,** 1 фл., 14 мл. Готовий до використання. Уникайте контакту з стоп розчином, оскільки він може викликати опіки.
 6. **Миочий розчин - 1 фл., 30 мл (40х концентрований).**
- Замітка: Додатковий 0 стандарт для розведенні зразків доступний по замовленню.

МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ.

1. Фотометр (450 нм±10 нм).
2. Калібровані мікропіпетки.
3. Дистильована вода.
4. Абсорбуючий папір.

ЗБЕРІГАННЯ

- При зберіганні при температурі 2-8°C активність реактивів буде збережена до дати виходу терміну. Не використовуйте після цієї дати.
- Всі вскриті реактиви необхідно зберігати при 2-8°C. Планшетка з лунками повинна зберігатись при 2-8°C. Після відкриття ящика треба знову тісно його запечатати.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

Приведіть всі реактиви і необхідні стріпи до кімнатної температури.

Миочий розчин

Розведіть 30 мл концентрованого миочого розчину з 1170 мл деонізованої води до кінцевого об'єму 1200 мл. *Розбавлений миочий розчин стабільний 2 тижні при кімнатній температурі.*

Знищення набору

Знищення набору повинно проводитись відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника на протязі одного тижня після отримання продукту. Окремі пошкодженні компоненти не слід використовувати.

ЗРАЗКИ

Можна використовувати (EDTA-, Гепарин – чи цитратну плазму)

Не використовуйте гемолітичні, істеричні чи ліпемічні зразки.

Збір зразків

Сироватка:

Збирайте кров, пунктуючи вену (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001); дозвольте їй зсістись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі.

Плазма:

Цілісну кров необхідно забрати в центрифужні пробірки, які містять антикоагулянти і центрифугувати негайно після забору.

(Наприклад, для EDTA плазми - Sarstedt Monovette – червона кришка - # 02.166.001; для гепаринової плазми - Sarstedt Monovette – оранжева кришка - # 02.165.001; для цитратної плазми - Sarstedt Monovette – зелена кришка - # 02.167.001)

Зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому виді можуть зберігатись при 2-8°C 5 днів. Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20°C. Після відтаювання зразки необхідно кілька разів легко потрясти перед тестуванням.

Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі, зразок сироватки показує значення вище найвищого стандарту, зразки можуть бути розведені 10- чи 100-кратно 0 стандартом і проаналізовані повторно.

- Розведення 1:10: 10 мкл сироватки + 90 мкл стандарт 0 (ретельно змішайте)
- Розведення 1:100: 10 мкл розведення 1:10 + 90 мкл стандарту 0 (ретельно змішайте).

ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ

Загальні зауваження

1. Приведіть всі реактиви до кімнатної температури перед початком тесту. Всі реактиви 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, реактиви приготвлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
5. За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ

Кожний аналіз включає стандартну криву.

1. Відділіть необхідну кількість лунок;
2. Додайте **20 мкл** Стандартів, Контролів і сироваткових зразків **кожний раз з новою насадкою** у відповідні лунки;
3. Додайте в кожну лунку **200 мкл** ензимного кон'югату;
4. Добре змішайте 10 секунд. Важливо досягнути повного змішування на даному етапі;
5. Інкубуйте **60 хвилин** при кімнатній температурі, не накриваючи планшет.
6. Різно вилийте вміст лунок;
Промийте лунки 3 рази Миочим розчином (400 мкл); Промокніть лунки на промокальню папері, щоб видалити залишки;
Важливе зауваження:
Чутливість і точність цього аналізу залежить від правильності проведення процедури промивання.
7. Додайте **100 мкл** Субстрату в кожну лунку;

8. Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі;
9. Зупиніть реакцію додаванням в кожну лунку **100 мкл** стоп-розчину;
10. Зчитайте дані на фотометрі при **450±10 нм** на протязі **10 хвилин** після додавання стоп розчину.

ВИРАХУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

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

Типовий приклад стандартної кривої:

Стандарт	нг/мл	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0	0	2,30
Стандарт 1	20	1,67
Стандарт 2	50	1,24
Стандарт 3	100	0,87
Стандарт 4	200	0,57
Стандарт 5	400	0,35
Стандарт 6	800	0,23

ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

Результати кортизолу в сироватці або плазмі знаходяться в межах від 50 до 230 нг/мл (138-635 нмол/л) між 8:00-10:00 год ранку і від 30 до 150 нг/мл (82,8-414 нмол/л) в 16:00 год.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ**Динамічний діапазон аналізу**

Діапазон аналізу знаходиться між 0-800 нг/мл.

Специфічність

Стероїд	Перехресна реактивність
Кортизол	100.0%
Кортикостерон	45%
Прогестерон	< 9%
Деоксикортизол	< 2%
Dexamethazone	< 2%
Estrilol	< 0.01%
Estrone	< 0.01%
Тестостерон	< 0.01%

Аналітична чутливість

Аналітична чутливість визначена як середнє за мінусом 2 стандартних відхилень (20 реплікантів) аналізу стандарту 0 – 2.5 нг/мл (6.9 нмол/л).

Точність**Внутрітестова**

Сироватка	N	середнє нг/мл	КВ %
1	20	43,5	8,1
2	20	226,5	3,2
3	20	403,6	5,6

Міжтестова

Сироватка	середнє нг/мл	КВ %
1	55	6,6
2	209	7,7
3	361	6,5

Достовірність**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 границі 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.

ВІДТВОРЮВАНІСТЬ

Зразки були збагачені додаванням кортизолу при відомій концентрації 1:1. Очікувані результати були визначені додаванням половини значень, визначених для нерозбавлених зразків і половини значень відомих розчинів. % відновлення обчислюється множенням коефіцієнта вимірювання і очікуваних значень на 100.

Сироватка	Введена конц. 1:1, нг/мл	Виміряна концентрація	Очікувана концентрація	Відтворюваність %
-----------	--------------------------	-----------------------	------------------------	-------------------

		я, нг/мл	нг/мл	
1	—	57	57,0	100
	200	110	128,5	89
	400	216	228,5	95
	800	436	428,5	102
2	—	240	240	100
	200	210	220	95
	400	356	320	111
	800	514	520	99
3	—	378	378	100
	200	263	289	91
	400	355	389	91
	800	558	589	95

ТЕСТ РОЗВЕДЕННЯ

Сироватка	Фактор розведення	Виміряна концентрація, нг/мл	Відтворюваність %
1	нерозвед.	48,0	—
	1:2	22,0	92
	1:4	12,9	108
	1:8	6,0	100
	1:16	3,3	110
2	нерозвед.	255,0	—
	1:2	118,0	93
	1:4	63,1	99
	1:8	34,2	107
	1:16	15,9	100
3	нерозвед.	427	—
	1:2	190	89
	1:4	97	91
	1:8	50	94
	1:16	25	94

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ**Впливаючі речовини**

Будь-яка неналежна робота зі зразками чи зміна тесту може впливати на результати.

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0,5 мг/мл) і тригліцериди (до 7,5 мг/мл).

Побічний ефект

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарств), що впливають на вимірювання кортизолу в зразку.

ЮРИДИЧНІ АСПЕКТИ**Достовірність результатів**

Тест необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Тестові результати вважаються достовірними, якщо контролі знаходяться в указаних межах і якщо інші тестові параметри також відповідають тестовій специфікації.

Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного тесту і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

Надійність

Будь-які зміни теста чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах тесту. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.

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