



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРТИЗОЛА МЕТОДОМ ИФА

Тест для количественного определения кортизола в слюне человека

Кат.№ CAN-C-290
Производитель: Diagnostics Biochem Canada Inc., (Канада)

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

Методика от 26-10-2010
Версия 4.0

Только для использования в исследовательских целях. Не для использования в диагностике

ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения кортизола в слюне человека методом иммуноферментного анализа.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод основан на обычном иммуноферментном анализе с использованием конкурентного связывания. Немеченый антиген (дигидротестостерон, присутствующий в образцах, контролях и стандартах) и меченый ферментом антиген (конъюгат) во время инкубации конкурируют за ограниченное количество сайтов связывания антител, иммобилизованных в лунках микропланшета. Затем, после промывки, добавляется ферментный субстрат. Энзиматическая реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Абсорбция измеряется с помощью микропланшетного анализатора. Интенсивность окрашивания, сформировавшегося в ходе энзиматической реакции, обратно пропорциональна концентрации дигидротестостерона в образце. Для построения калибровочной кривой используется набор стандартов. Концентрация дигидротестостерона в исследуемых образцах может быть рассчитана непосредственно из калибровочной кривой.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Кортизол является одним из наиболее циркулирующих стероидов и основным глюкокортикоидом, продуцируемым корой надпочечника. Кортизол физиологически эффективен в поддержании кровяного давления и противовоспалительной активности. Он также принимает участие в поглощении кальция, глюконеогенезисе, а также в секреции кислоты желудочного сока и пепсина. Уровень кортизола повышается в стрессовых ситуациях, при физической нагрузке и при внешнем управлении АКГТ. Измерение уровней кортизола в общем может использоваться в качестве индикатора функции адреналина и для диагностирования болезни Аддисона и Кушинга, а также артериальной гипертензии и карциномы.

Экскреция кортизола в моче происходит, в основном, в несвязанной (свободной) форме. Определение уровней кортизола в слюне – прекрасный показатель концентрации свободного или биологически активного кортизола в человеческой сыворотке.

Исследование кортизола в слюне имеет несколько преимуществ по сравнению с определением кортизола в сыворотке или плазме. Во-первых, сбор слюны – неинвазивный и недорогой способ и легко осуществляется у детей и младенцев. Во-вторых, несколько образцов, в случае серийных анализов (в течение суток) можно собирать в домашних условиях.

Продукция кортизола подчинена АКГТ-зависимому циркадному ритму с пиковыми уровнями рано утром и самыми низкими уровнями ночью. Факторы, регулирующие этот циркадный ритм, пока окончательно не ясны, однако известно, что установление данного ритма происходит в раннем детстве и может нарушаться по ряду физических и психологических причин [9]. Более того, повышенные количества АКГТ и кортизола вырабатываются в ответ на физический и психологический стресс независимо от циркадного ритма.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для успешного проведения анализа необходимо полное понимание данной инструкции пользователями. Достоверные результаты могут быть получены только при строгом и тщательном соблюдении данной инструкции, предоставляемой с набором.
2. Контрольные материалы или пулы сывороток с высоким и низким значениями должны быть включены в каждую постановку для оценки достоверности результатов.
3. Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.
4. Для того чтобы избежать контакта с потенциально опасными веществами, необходимо надевать перчатки при работе с реагентами набора и образцами сывороток.
5. Все образцы и реагенты набора должны достичь комнатной температуры и быть аккуратно, тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
6. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.
7. Контроли должны быть включены в каждую постановку. Их значения, полученные при тестировании, должны соответствовать указанному диапазону допустимых значений.
8. Неточное соблюдение процедур, техники анализа, неточное пипетирование, неполные промывки, а также несоблюдение условий хранения реагентов набора может привести к недостоверным результатам, к тому, что результат, полученные для контроля, не попадет в диапазон допустимых значений.
9. Присутствие пузырьков воздуха в лунках микропланшета влияет на результаты при считывании оптической плотности (ОП) с использованием микропланшетного анализатора. Перед считыванием результатов тщательно удалите все пузырьки с поверхности жидкости.
10. Раствор субстрата (ТМВ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным при правильном хранении. Нестабильность или загрязнение реагента могут проявиться в виде окрашивания реагента в голубой цвет. В этом случае реагент использовать нельзя.
11. При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
12. Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
13. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
14. Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения Кортизола в слюне человека. Данный набор не предназначен для определения DHT в сыворотке, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тимерозал не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
3. Для разведения слюны с высокими концентрациями может быть использован только калибратор А. Использование любого другого реагента может привести к ложным результатам.
4. Результаты, полученные с помощью данного набора, никогда не должны использоваться как единственное основание для постановки диагноза. Например, присутствие гетерофильных антител у пациентов, регулярно контактирующих с животными или с материалами животного происхождения, потенциально может влиять на результаты иммунологического анализа. Следовательно, клиническая диагностика должна базироваться на полном обследовании пациента, учитывая, в том числе, интенсивность контактов с животными/продуктами, если можно подозревать ложные результаты.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

ПОТЕНЦИАЛЬНО БИООПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Сыворотка человека, которая могла быть использована при приготовлении реагентов, стандартов и контролей, была протестирована с отрицательными результатами на содержание поверхностного антигена гепатита В, антител к ВИЧ и вирусу гепатита С. Однако не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие таких инфекционных агентов как ВИЧ, гепатит В, С и других. Таким образом, реагенты должны рассматриваться как биологически опасные материалы и обращаться с ними необходимо в соответствии с нормами, принятыми в лаборатории для образцов крови.

ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ

Избегайте контактов с реагентами, содержащими ТМВ, перекись водорода и соляную кислоту. При контакте с такими реагентами тщательно промойте место контакта большим количеством воды. ТМВ может быть канцерогенным веществом.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для проведения анализа в дублях необходимо приблизительно 1 мл слюны. Соберите 4-5 мл слюны без применения силы и побуждения и перед употреблением пищи, напитков или перед чисткой зубов. Просто сполосните рот водой перед забором образца. Не использовать образцы с кровью. Храните при 4 °С не более 24 часов. Для более длительного хранения необходимо заморозить образец при температуре -10 °С или ниже. Считайте все образцы человеческого происхождения потенциально инфекционно опасными и обращайтесь с ними с соответствующими предосторожностями.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Пробирки для забора образцов поместить в морозилку и дать им замерзнуть. Перед использованием образцы разморозить и центрифугировать. Супернатанты собирать в помеченные пробирки.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Дозаторы на 50, 100, 150 и 300 мкл
2. Одноразовые сменные наконечники
3. Деионизированная или дистиллированная вода
4. Микропланшетный шейкер
5. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 450 нм и верхним пределом ОП 3.0 или более* (см. шаг 10 процедуры)

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. Микропланшет, покрытый кроличьими антителами анти-Кортизол (с «ломаемыми» стрипами) - 96-ячеечный микропланшет (8x12), покрытый поликлональными антителами в закрываемом пакете с осушителем. Готов к использованию.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

2. Концентрат конъюгата Кортизол-пероксидаза хрена (HRP) – требует приготовления.

Содержание: Конъюгат Кортизол-HRP в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 300 мкл во флаконе

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Перед использованием развести концентрат в соотношении 1:50 в рабочем буфере (например, 40 мкл HRP в 2 мл буфера для анализов). При использовании всего микроплшета разведите 240 мкл HRP в 12 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

3. Калибраторы Кортизола слюны - готовы к использованию.

Содержание: 6 флаконов, содержащих Кортизол в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлены добавлением известных количеств Кортизола в матрикс.

* В таблице приведены приблизительные концентрации, точные значения указаны на этикетках флаконов.

Калибратор	Концентрация (нг/мл)	Объем/флакон (мл)
Калибратор А	0	2.0
Калибратор В	1	0.6
Калибратор С	3	0.6
Калибратор D	10	0.6

Калибратор Е	30	0.6
Калибратор F	100	0.6

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: невскрытые флаконы хранятся 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия калибраторы должны быть использованы в течение 14 дней или аликвотированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

4. Контроли – готовы к использованию.

Содержание: 2 флакона, содержащие Кортизол в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлен с добавлением определенного количества Кортизола в буфер. Ожидаемое значение и допустимый диапазон указаны на этикетке флакона.

Объем: 0.6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: невскрытый флакон хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия контроль должен быть использован в течение 14 дней или аликвотированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

5. Концентрат промывочного буфера – требует приготовления.

Содержание: 1 флакон, содержащий буфер с неионным детергентом и консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 50 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Развести в соотношении 1:10 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. Если для анализа используется весь микропланшет, разведите 50 мл концентрата промывочного буфера 450 мл воды.

6. Рабочий буфер – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий белковый буфер с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 15 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

7. Субстрат ТМБ – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий тетраметилбензидин и перекись водорода в не-DMF или DMSO содержащем буфере.

Объем: 16 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

8. Стоп-раствор – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий 1М серной кислоты.

Объем: 6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Подготовка образцов:

Заморозка и центрифугирование

Все реагенты привести к комнатной температуре перед использованием. Калибраторы, контроли и образцы должны тестироваться в дублях. Вся процедура анализа должна проводиться непрерывно.

1. Приготовить рабочие растворы конъюгата Кортизол-HRP и промывочного буфера.
2. Отделить требуемое количество микролуночных полосок. Неиспользуемые полоски запечатать обратно в пакет и поместить в холодильник.
3. Пипетировать по 50 мкл калибратора, контроля и образца в дублях в помеченные ячейки.
4. Пипетировать 100 мкл конъюгата рабочего раствора в каждую лунку (рекомендуется использование мультиканальной пипетки).
5. Инкубировать в течение 45 минут (приблизительная скорость 200 об/мин) при комнатной температуре на шейкере.
6. Промыть лунки 3 раза с 300 мкл разбавленного промывочного

раствора на каждую лунку и постучать микропланшетом по фильтровальной бумаге, убедиться, что он сухой (рекомендуется использование автоматического промывочного устройства).

- Пипетировать 150 мкл Субстрата ТМБ в каждую лунку с одинаковой скоростью.
- Инкубировать на шейкере в течении 15-20 минут при комнатной температуре (или до тех пор, пока калибратор А не достигнет темно-синего окраса для необходимой ОП).
- Пипетировать 50 мкл стоп раствора в каждую лунку с одинаковой скоростью как в шаге 7.
- Определить ОП ячеек с помощью микропланшетного ридера при 450 нм в течение 20 минут после добавления стоп раствора.

*если ОП выходит за верхний предел обнаружения или если фильтр в 450 нм недоступен, можна использовать фильтр с длиной волны 405 или 415 нм. ОП будут ниже, но это не повлияет на результаты.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого калибратора.
- Постройте калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности калибраторов, а по оси X - их концентрацию. Если возможно, рекомендуется использование программного обеспечения для построения 4-параметрической или 5-параметрической калибровочной кривой.
- Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.
- Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой.
- Если результат превышает 100 нг/мл, образец необходимо развести стандартом А в соотношении не более чем 1:8. Полученный результат необходимо умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, СВЕДЕННЫЕ В ТАБЛИЦУ:

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Значение (нг/мл)
A	2.241	2.133	2.187	0
B	1.965	1.914	1.940	1
C	1.757	1.799	1.778	3
D	1.221	1.254	1.238	10
E	0.540	0.502	0.521	30
F	0.222	0.216	0.219	100
неизвестный	0.287	0.283	0.285	63

ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Приводится только в демонстрационных целях и **не должен использоваться** для расчета результатов. См. оригинал инструкции.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность:

Нижний предел обнаружения рассчитан исходя из калибровочной кривой вычитанием двух стандартных отклонений из среднего значения ОП нулевого стандарта (стандарт А), измеренного 10 раз. Чувствительность метода dbc Cortisol Saliva ELISA составила **1.0 нг/мл**.

Специфичность (перекрестная реактивность):

Перечисленные ниже соединения были протестированы на перекрестную реактивность с помощью данного метода, при 100% перекрестной реактивности для Cortisol Saliva ELISA:

Стероид	Перекрестная реактивность, %
Кортизол	100
Преднизолон	13.6
Кортикостерон	7.6
Деоксикортикостерон	7.2
Прогестерон	7.2
Кортизон	6.2
Деоксикортизол	5.6
Преднизон	5.6
Дексаметазон	1.6

Перекрестная реактивность не наблюдалась с дегидроэпиандростероном и тетрагидрокортизоном.

Пожалуйста, обратите внимание на то, что наблюдалась перекрестная реактивность с преднизолоном со значением 13.6 %. Так как преднизон преобразовывается в преднизолон in-Vivo, необходимо быть внимательными при определении уровней кортизола у пациентов, проходящих курс лечения.

Точность внутри серии:

3 образца были проанализированы 10 раз каждый, по одной калибровочной кривой. Результаты (в нг/мл) приведены ниже:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	6.6	0.68	10.3
2	24.8	1.98	8.0
3	52.4	3.40	6.5

Точность между сериями:

3 образца анализировали 10 раз каждый в течение 4 недель.

Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	6.3	0.63	9.8
2	23.7	2.06	8.7
3	51.8	3.37	6.5

Воспроизводимость

Насыщенные образцы были приготовлены добавлением определенных количеств кортизола к трем образцам слюны пациентов. Результаты (в нг/мл) приведены в таблице. См. оригинал инструкции.

Линейность

3 образца слюны пациентов были разведены калибратором А.

Результаты (в нг/мл) приведены в таблице. См. оригинал инструкции.

ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Как и для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений.

Произвольные мужские и женские образцы были взяты рано утром и имели абсолютный диапазон:

5 - 21.6 нг/мл

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул. Черновола, 97,

г. Ивано-Франковск, 76005

тел./факс: (0342) 52-57-10

80681043216 (безлимит)

E-mail: info@biotechlab-s.com

www.biotechlab-s.com