



Набор ИФА для количественного определения в сыворотке или плазме человека КОРТИЗОЛА

Кат. № : KS18EW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 09-2007

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

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(См. на стр. 12 в оригинале инструкции).

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Настоящий набор основан на конкурирующем методе иммуноферментного анализа (ИФА). В течение первой инкубации кортизол в образце конкурирует с кортизолом, конъюгированным пероксидазой хрена (конъюгатом) за определенные зоны антисыворотки, нанесенной на лунки. После инкубации весь свободный материал удаляется циклом аспирации и промывания. Ферментная активность, относящаяся в твердой фазе, будет обратно пропорциональной концентрации кортизола в калибраторах и образцах и будет наблюдаться при добавлении в лунки раствора хромогена (ТМБ) в буфере субстрата. Колориметрическое считывание будет проводиться с использованием спектрофотометра при длине волны 450 нм и 405 нм.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

- **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок, покрытых моноклональным антителом (мишиным) анти-кортизола. Хранить неиспользуемые лунки в прилагаемом полиэтиленовом пакете тщательно закрытыми.
- **Калибраторы:** 6 флаконов кортизола с PBS, BSA и стабилизаторами, лиофилизированные следующих концентраций: 0, 10, 30, 100, 300 и 900 нг/мл. Консервант: неомидин. Готовы к использованию. Растворить калибраторы 1 мл дистиллированной H₂O. После растворения хранить при 2-8°C 10-15 дней; при более длительном хранении заморозить при -20°C
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (2,7 мл) кортизола, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRPO) в буфере с BSA, ANS и стабилизаторами. Консервант: неомидин. Перед использованием добавить 1,2 мл конъюгата в флакон с разбавителем конъюгата и тщательно перемешать. Хранить разбавленный конъюгат при 2-8°C на протяжении 8 недель.
- **Разбавитель конъюгата:** 2 флакона (12 мл) цитратного буфера и BSA. Консервант: неомидин и тимеросал (<0.05%). Готовый к использованию.
- **Контрольная сыворотка:** 1 флакон кортизола в протеиновой основе. Лиофилизированная. Консервант: неомидин. Растворить 1 мл дистиллированной H₂O. После растворения хранить при 2-8°C 5-7 дней; при более длительном хранении заморозить при -20°C
Примечание: точные концентрации указаны в листе Контроля Качества.
- **Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween. Консервант: тимеросал (<0.05%). Разбавить содержимое флакона дистиллированной водой до 500 мл. В случае нерастворимых кристаллов растворите раствор, поместив

- флакон на несколько минут в температуру 37°C. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 30 дней при 2-8°C.
- **Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМБ с цитрат-фосфатным буфером и DMSO. Жидкий.
- **Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Готовый к использованию.
Примечание: Чтобы получить раствор субстрата смешайте равные порции хромогена и субстратного буфера, используя чистый, тщательно очищенный флакон. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течении 1 часа после подготовки.
- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готовый к использованию.
 - Самоклеющаяся пленка для планшета.
 - Полиэтиленовый пакет.

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Мерные колбы для разбавления реагентов.
- Микропланшетный шейкер, установленный на 1200 об/мин.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с интервалом 0-3,0 А при длине волны 450 и 405 нм.
- Миллиметровая графопостроительная бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

5. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащей загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
 - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
 - периодам инкубации и температуре,это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходит регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбопытная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.

- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Храните образцы при 2-8°C в течении 1-2 дней. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы при -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Образцы с концентрациями КОРТИЗОЛ более чем 50мкМЕ/мл необходимо разбавить нулевым калибратором. Рекомендуется проводить разбавление в соотношении 1:5 (100 мкл образца + 400 мкл нулевого калибратора).

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА*

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
 - переворачивая образец, смешайте его перед использованием.
1. Приготовьте лунки для: бланка, калибраторов, контрольной сыворотки и образцов.
 2. Раскапать в соответствующие лунки по **10 мкл** каждого калибратора, контрольной сыворотки и образца.
 3. Раскапать по **200 мкл** ферментного конъюгата во все лунки, кроме лунки бланка.
 4. После накрывания планшета липкой пленкой инкубируйте лунки в течении **60 +/- 5 мин. при 37+/-2°C**.
 5. Удалите липкую пленку и осторожно проведите аспирацию инкубационной смеси во всех лунках.
 6. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию всей жидкости из лунок.
 7. Раскапать во все лунки по **200 мкл** предварительного подготовленного раствора субстрата (см. раздел Реагенты).
 8. Инкубируйте лунки в течении **15 мин. при 37+/-2°C**, избегать солнечного света.
 9. Раскапать по **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
 10. Считайте ОП желательно бихроматичным фотометром **при 450 и 405 нм** с референтной длиной волны 620 нм (обнулив аппарат лункой бланка) в течении **20 минут** после завершения анализа. В случае выхода абсорбции из диапазона считайте ее при 405 нм.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 23 в оригинале инструкции).

9. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для достижения большей чувствительности существующий метод включает спектрофотометрическое считывание при тройной длине волны: 450, 405 и 620 нм, таким образом расширяя диапазон кривой. Для получения лучшей чувствительности этим методом используется спектрофотометрическое считывание при использовании двух волн шириной 450 и 405 нм. Для образцов с концентрациями кортизола от 30 до 900 нг/мл считайте при длине волны 450 нм; для образцов с уровнем кортизола ниже 30 нг/мл, считывайте при длине волны 405 нм. Нарисуйте калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, выводя концентрацию калибратора (ось x) напротив абсорбции для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации кортизола в нг/мл получаются путем интерполяции абсорбций каждого образца на калибровочной кривой.

9.1 ПРИМЕР РАСЧЕТА

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться вместо экспериментальных данных.

Описание	Абсорбция при 450 нм	Кортизол	Абсорбция при 405 нм	Кортизол
Калибратор 0 нг/мл	> 3000		1.126	
Калибратор 10 нг/мл	> 3000		1.020	
Калибратор 30 нг/мл	2161		0.750	
Калибратор 100 нг/мл	1211		0.417	
Калибратор 300 нг/мл	0.514		0.177	
Калибратор 900 нг/мл	0.215		0.075	
Образец 1	> 3000	150 нг/мл	0.983	13 нг/мл
Образец 2	0.957		0.330	

9.2 Значения нормы

Указанные ниже значения считаются показательными. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный диапазон нормы.

Утро:	45 - 220 нг/мл
После обеда:	25 - 110 нг/мл

В случае проведения динамических исследований были зафиксированы следующие ожидаемые значения:

- Стимуляция адренкортикотропином: более чем в 2 раза больше референтного значения (обычно в 3-5 раз);
- Угнетение метирапоном: ниже исходного уровня;
- Угнетение дексаметазоном: ниже исходного уровня.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Специфичность

Этот метод дал следующие перекрестные реакции: 100 % с кортизолом, 1.2 % с кортизоном, 1.1 % с кортиостероном, 4.6 % с 11-деоксикортизолом, 0.4 % с преднизолоном, 35.8 % с преднизолоном, 0.3 % с деоксикортикостероном, 0.6 % с 17-гидроксипрогестероном, и менее чем 0.1 % с прогестероном. Никаких перекрестных реакций не наблюдалось с тестостероном, эстроном, эстрадиолом, эстриолом и андростенедионом.

Хотя некоторые стероиды показывают некоторую перекрестную реактивность, их физиологическая концентрация более низкая чем концентрация кортизола, и таким образом, они незначительно повлияют на измерение кортизола. Однако, следует соблюдать осторожность с пациентами, проходящими терапию преднизолоном, поскольку их перекрестная реактивность может достигать приблизительно 36%. Кроме того, поскольку преднизон превращается при обмене веществ в преднизолон, необходимо соблюдать осторожность при обнаружении кортизола в пациентах, подвергающихся любой из этих двух терапий.

10.2 Чувствительность

Была определена на основании калибровочной кривой и выражена в минимальной дозе, значительно отличающейся от нулевого калибратора (средн. значение + 2 CO). Эта доза составляет **5,0 нг/мл**.

10.3 Точность

Была оценена при определении вариабельности в анализе и между ними на основании 3 сывороток при разных концентрация кортизола.

Повторяемость (в анализе)

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во репликатов
A	32,3	2,00	6,2	10
B	164,2	7,59	4,6	10
C	246,8	9,92	4,0	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн. (нг/мл)	СО +/-	КВ (%)	К-во анализов
A	29,2	2,03	6,9	10
B	156,6	6,70	4,3	10
C	254,2	15,54	6,1	10

10.4 Достоверность

Проверена при проведении испытаний на восстановление и параллелизм:

10.5 Испытание на восстановление

Известные количества кортизола были добавлены к сыворотке и проанализированы.

Добавлено (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)	Восстановление %
S1	---	35.0	----
S1 + 37,5	72.5	70.0	96.5
S1 + 75,0	110.0	105.0	95.4
S1 + 150,0	185.0	195.0	105.4
S1 + 300,0	335.0	350.0	104.5

10.6 Испытание на параллелизм

Сыворотка с высокой концентрацией кортизола была проверена нулевым калибратором при разных разбавлениях.

Разбавление	Ожидаемое значение (нг/мл)	Полученное значение (нг/мл)
S2 неразбавл.	---	289,9
1:2	144,9	155,0
1:4	72,5	74,0
1:8	36,2	35,1
1:16	18,1	18,8

11 . ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты этого анализа должны тщательно интерпретироваться и подтверждаться клиническими оценками и дальнейшими диагностическими исследованиями.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: (0342) 77 51 22;
тел./факс: (0342) 77 56 12
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua