



IMMUNOASSAYS AND SERVICES

BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Інструкція з використання Кортизол ІФА

REF MS E-5000



IVD

CE

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

1. ВВЕДЕННЯ

1.1 Використання за призначенням

Кортизол ІФА - це імуноферментний аналіз для кількісного вимірювання *in vitro* діагностики Кортизолу у сироватці крові та плазмі (ЕДТА-, гепарин- або цитратна плазма).

1.2 Загальна інформація та пояснення

Кортизол / гідрокортизон, з'єднання F) є основним кортикостероїдом, який виділяється у людини кори надниркових залоз.

Цей стероїдний гормон має молекулярну масу 363,5.

У більшості фізіологічних станів лише близько 10% кортизолу в плазмі циркулює без зв'язку з транскортином і альбуміном. Серед продуктів кори надниркових залоз людини в регуляції лежить лише кортизон секреції АКТГ.

З підвищенням рівня вільного (небілкового) кортизолу в крові вивільнення АКТГ гальмується негативним ефектом зворотного зв'язку. І навпаки, якщо рівень кортизолу є субнормальним, негативний зворотний зв'язок зменшується, рівень АКТГ підвищується, а кора надниркових залоз виділяє кортизол до відновлення нормального рівня крові.

Вивільнення АКТГ знаходиться під контролем гіпоталамічного гормону, що вивільняє кортикотрофін (CRH); негативна ідентифікована система зворотного зв'язку з кортизолом як на рівні гіпоталамуса, так і на гіпофізі. (1).

Зазвичай протягом дня спостерігається коливання кортизолу, що досягає найвищого рівня вранці та найнижчого протягом ночі. Корисна інформація надається, коли вимірювання кортизолу проводиться у зразках, вилучених при фіксованій годині (8.00 год.).

Основними біологічними ефектами кортизолу є: сприяння гліюкогенезу, осадження гліюгену печінки, підвищення концентрації глюкози в крові при зниженні використання вуглеводів, вплив на жир, обмін речовин та протизапальна дія.

Вимірювання кортизолу є потужним інструментом для оцінки підозр на порушення виробництва гліюкортикоїдів: синдром Кушинга (гіперкортизолізм), хвороба Аддісона або вторинна недостатність надниркових залоз гіпокортизолізм). У багатьох випадках необхідно проводити динамічні тести (придушення чи стимуляцію), щоб локалізувати дефект на одному з трьох основних рівнів (тобто наднирників, гіпофіза, гіпоталамуса).

2. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Кортизол ІФА набір - це твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА), заснований на принципі конкурентного зв'язку.

Лунки мікропланшету покриті моноклональним антитілом, спрямованим до антигенного сайту на молекулі кортизолу. Ендогенний кортизол зразка пацієнта конкурує з кортизолом - пероксидазою хрому кон'югатом для зв'язування з покритим антитілом. Після інкубації незв'язаний кон'югат змивається.

Кількість пов'язаного пероксидазного кон'югату обернено пропорційна концентрації кортизолу в зразку. Після додавання субстратного розчину інтенсивність розробленого кольору обернено пропорційна концентрації кортизолу в зразку пацієнта.

3. Попередження та запобіжні заходи

1. Цей комплект призначений тільки для діагностики *in vitro*. Тільки для професійного використання.
2. Усі реагенти цього тестового набору, які містять людську сироватку або плазму, були протестовані та підтверджені негативними для ВІЛ I / II, HBsAg та HCV за затвердженими FDA процедурами. Однак всі реагенти повинні розглядатися як потенційна біологічна небезпека, яка використовується та утилізується.
3. Перш ніж почати аналіз, прочитайте інструкцію повністю і уважно. Використовуйте дійсну версію інструкції по застосуванню, що додається до набору. Будьте впевнені, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет містить стріпи, що знімаються. Невикористані лунки слід зберігати при температурі 2 ° C - 8 ° C в герметичному пакеті з фольги і використовувати в наданому тримачу.
5. Піпетування зразків і реагентів повинно проводитися якомога швидше і в тій же послідовності для кожного кроку.

6. Використовуйте резервуари лише для одиночних реагентів. Особливо це стосується резервуарів субстрату. Використання резервуару для дозування субстратного розчину, який раніше використовувався для розчину кон'югату, може перетворити розчин на кольоровий. Не переливайте реагенти назад у флакони, оскільки можливе забруднення реагентом.

7. Ретельно перемішайте вміст лунок мікропланшетів, щоб забезпечити хороші результати випробувань. Не використовуйте повторно мікролунки.

8. Не давайте лунки висохнути під час проведення аналізу; додайте реагенти відразу після завершення етапів промивання.

9. Дозвольте реагентам досягти кімнатної температури (21 ° C - 26 ° C) перед початком випробування. Температура буде впливати на показники поглинання аналізу. Однак на значення зразків пацієнтів це не вплине.

10. Ніколи не піпетуйте через рот і не уникайте контакту реагентів і зразків зі шкірою та слизовими оболонками.

11. Не паліть, не їжте, не пийте та не застосовуйте косметику в місцях, де обробляються зразки або реагенти для набору.

12. Надягайте одноразові рукавички з латексу під час роботи з зразками та реативами. Мікробне забруднення реагентів або зразків може дати помилкові результати.

13. Поводження повинно здійснюватися відповідно до процедур, визначених відповідними настановами з національної біологічної небезпеки чи правилами безпеки.

14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетках набору.

15. Всі зазначені томи повинні бути виконані відповідно до протоколу. Оптимальні результати тесту отримані тільки при використанні каліброваних піпеток і рідерів мікропланшетів.

16. Не змішуйте і не використовуйте компоненти з наборів з різними номерами партій. Рекомендується не обмінювати лунки різних планшетів навіть з однієї партії. Набори можуть бути відправлені або зберігатися в різних умовах і характеристики зв'язування планшетів можуть трохи відрізнятись.

17. Уникайте контакту зі стоп-розчином, що містить 0,5 M H₂SO₄. Це може викликати роздратування шкіри і опіки.

18. Деякі реагенти містять Proclin 300, BND і / або MIT в якості консервантів. У разі контакту з очима або шкірою, негайно промити водою.

19. Субстрат ТМБ подразнює шкіру і слизову оболонку. У разі можливого контакту промийте очі рясним обсягом води і шкіру з милом і щедрою водою. Вимийте забруднені предмети перед їх повторне використанням. При вдиханні вивести людину на відкрите повітря.

20. Хімічні речовини і підготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до національного законодавства, керівництва або постановою про безпеку біологічної небезпеки.

21. Інформацію про небезпечні речовини, що входять в комплект, див. в паспорті безпеки.

Паспорти безпеки для цього продукту можна отримати за запитом безпосередньо у виробника

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти надані

MS E-5031 мікропланшети

Зміст: стріпи 12x8 (розбірні), 96 лунок;

Лунки, покриті анти - кортизол антитілом (моноклональним).

Стандарти - готові до використання

Кат. №	компонент	стандарт	Концентрація нг/мл	Обсяг /флакон
MS E 5001	Стандарт А	Стандарт А	0	1 мл
MS E 5002	Стандарт В	Стандарт В	20	1 мл
MS E 5003	Стандарт С	Стандарт С	50	1 мл
MS E 5004	Стандарт D	Стандарт D	100	1 мл
MS E 5005	Стандарт Е	Стандарт Е	200	1 мл
MS E 5006	Стандарт F	Стандарт F	400	1 мл
MS E 5007	Стандарт G	Стандарт G	800	1 мл

Перетворення: 1 нг / мл = 2,76 нмоль / л; що відповідає 0, 55,2, 138, 276, 552, 1104, 2208 нмоль / л

Зміст: містять не ртутний консервант

MS E-5040 CONJUGATE Ферментний кон'югат - готовий до використання

Зміст: кортизол, кон'югований з пероксидазою хрому;

містить не ртутний консервант.

Об'єм: 1 x 25 мл

ME E-0055 розчин субстрату - готовий до використання

Зміст: Тетраметилбензидин (ТМБ).

Об'єм: 1 x 14 мл

Небезпеки

ідентифікація:

H360D Може пошкодити ненароджену дитину.

FR E-0080 Stop Soln стоп розчин - готовий до використання

Зміст: містить 0,5 М H₂SO₄.

Уникайте контакту з розчином стоп. Це може викликати подразнення шкіри та опіки.

Об'єм: 1 x 14 мл



Небезпеки

ідентифікація:

H290 Може бути агресивним для металів.

H314 Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей.

FR E-0030 WASH CONC Промивний розчин - 40x концентрований

Об'єм: 1 x 30 мл

див. „ Підготовка реагентів ”.

Примітка: Додатковий стандарт А для розведення зразків доступний по запиті.

4.2 Необхідні матеріали, не надані

- Калібрований рідер мікропланшету (450 ± 10 нм)
- Калібровані мікропіпетки зі змінною точністю.
- Абсорбуючий папір.
- Дистильована або дейонізована вода
- Таймер
- Графічний папір або програмне забезпечення для обробки даних

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при 2 ° С - 8 ° С незакриті реагенти зберігатимуть реакційну здатність до терміну придатності.

Не використовувати реагенти після цієї дати.

Відкриті реагенти потрібно зберігати при температурі 2 ° С - 8 ° С. Лунки мікропланшетів необхідно зберігати при температурі 2 ° С - 8 ° С. Після відкриття пакету з фольги, слід подбати про те, щоб знову його щільно закрити.

Відкриті набори зберігають активність протягом 5 тижнів, якщо вони зберігаються, як описано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням всі реагенти та необхідну кількість стріпів доведіть до кімнатної температури.

Миючий розчин

Додайте дейонізовану воду до 40x концентрованого промивного розчину.

Розвести 30 мл концентрованого промивного розчину 1170 мл дейонізованої води до кінцевого об'єму 1200 мл. Розведений промивний розчин стабільний протягом 2 тижнів при кімнатній температурі.

4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору потрібно проводити відповідно до національних норм. Для цього спеціальна інформація про продукт наведена у Листі даних про безпеку.

4.6 Пошкоджені тестові набори

У разі будь-якого серйозного пошкодження тестового набору або компонентів, виробник повинен бути повідомлений у письмовій формі, не пізніше, ніж через тиждень після отримання набору. Сильно пошкоджені окремі компоненти не слід використовувати для прогону. Вони повинні зберігатися, поки не знайдеться остаточне рішення. Після цього їх слід утилізувати згідно з офіційними регламентами.

5. ЗБІР ТА ПІДГОТОВКА

У цьому аналізі можуть використовуватися сироватка або плазма (EDTA-, гепарин - або цитратна плазма).

Не використовуйте гемолітичні, жовтяничні або ліпемічні зразки.

Зверніть увагу: проби, що містять азид натрію, не слід використовувати в аналізі.

5.1 Збір зразків

Сироватка:

Збирають кров за допомогою венепункції (наприклад, Sarstedt Monovette для сироватки), дають їй згортатися та відокремлюють сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до того, як відбулося повне згортання. Для пацієнтів, які отримують антикоагулянтну терапію може буде потрібно збільшення часу згортання.

Плазма:

Цільну кров слід збирати в пробірки для центрифуги, що містять антикоагулянт (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідним плазмовим препаратом) і центрифугують відразу після збору.

5.2 Зберігання та підготовка зразків

Зразки повинні бути закриті ковпачками та можуть зберігатися до 7 днів при температурі 2 ° C - 8 ° C до проведення аналізу.

Зразки, що тримаються довше, слід заморозувати лише один раз при температурі -20 ° C до аналізу.

Розморожені зразки перед тестуванням слід перевернути кілька разів.

5.3 Розведення зразку

Якщо в початковому аналізі виявлено, що зразок містить більше, ніж найвищий стандарт, зразки можуть бути розбавлені зі стандартом А і повторно досліджені, як описано в процедурі аналізу.

Для розрахунку концентрацій цей коефіцієнт розведення необхідно враховувати.

Приклад:

а) розведення 1:10: 10 мкл проби + 90 мкл стандарт А (ретельно перемішати)

б) розведення 1: 100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл Стандарт А (ретельно перемішати).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Усі реагенти та зразки повинні бути доведені до кімнатної температури перед використанням. Усі реагенти повинні бути змішані без піноутворення.

- Після того, як тест розпочато, всі кроки повинні бути виконані без перерви.

- Використовуйте нові наконечники пластикової піпетки для кожного стандарту, контролю або зразка, щоб уникнути перехресного забруднення.

- Поглинання - це функція часу та температури інкубації. Перш ніж почати аналіз, рекомендується, щоб усі реагенти були готові, зняті ковпачки, усі необхідні лунки були закріплені у тримачі тощо. Це забезпечить рівний пройдений час для кожного кроку піпетування без перерви.

- Як правило, ферментативна реакція лінійно пропорційна часу та температурі.

6.2 Процедура аналізу

Кожен прогін повинен включати стандартну криву.

1. Закріпіть потрібну кількість лунок мікропланшету у тримачі .
2. Дозуйте 20 мкл кожного стандарту, контролю та зразку з новими одноразовими наконечниками у відповідні лунки.
3. Розмістіть по 200 мкл ферментного кон'югату в кожному лунку.
Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. На цьому етапі важливо повноцінне перемішування.
4. Інкубуйте протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
5. Жорстко струсити вміст лунок.

Промийте лунки 3 рази розведеним промивним розчином (400 мкл на лунку). Різко вдарити лунками об абсорбуючий папір для видалення залишкових крапель.

Важлива примітка:

На чутливість і точність цього аналізу помітно впливає правильність виконання процедури миття!

6. Додайте 100 мкл субстратного розчину в кожному лунку.
7. Інкубуйте протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.
8. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши 100 мкл стоп-розчину в кожному лунку.
9. Визначте поглинання (ОГ) кожної лунки при 450 ± 10 нм за допомогою рідера мікропланшетів.
Рекомендується прочитати лунки протягом 10 хвилин після додавання стоп-розчину.

6.3 Розрахунок результатів

1. Обчисліть середні значення поглинання для кожного набору стандартів, контролю та зразків пацієнта.
2. Використовуючи напівлогарифмічний графічний папір, побудуйте стандартну криву нанесенням отриманого середнього поглинання від кожного стандарту проти його концентрації зі значенням поглинання на вертикальній (Y) осі та концентрації на горизонтальній (X) осі.
3. За допомогою середнього значення поглинання для кожного зразка визначають відповідну концентрацію від стандартної кривої.
4. Автоматизований метод: Результати в Інструкціях по застосуванню були розраховані автоматично за допомогою 4-параметричної кривої. (4 параметри Rodbard або 4 Parameter Marquardt є кращими методами.) Інші функції обробки даних можуть дати дещо інші результати.
5. Концентрацію зразків можна прочитати безпосередньо з цієї стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж найвищий стандарт, необхідно додатково розбавити або повідомити як > 800 нг / мл Для розрахунку концентрацій цей коефіцієнт розведення повинен враховуватися.

6.3.1 Приклад типової стандартної кривої

Наведені нижче дані є лише для демонстрації і не можуть бути використані замість генерації даних під час аналізу.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт А (0 нг/мл)	2,30
Стандарт В (20 нг/мл)	1,67
Стандарт С (50 нг/мл)	1,24
Стандарт D (100 нг/мл)	0,87
Стандарт Е (200 нг/мл)	0,57
Стандарт F (400 нг/мл)	0,35
Стандарт G (800 нг/мл)	0,23

7. Очікувані НОРМАЛЬНІ значення

Настійно рекомендується, щоб кожна лабораторія визначала свої власні нормальні та аномальні значення.

Значення кортизолу в сироватковому або плазмовому діапазонах від 50 нг / мл до 230 нг / мл (138 - 635 нмоль / л) між 8:00 та 10:00 ранку, і від 30 нг / мл до 150 нг / мл (82,8 - 414 нмоль / л) о 16:00.

Ці значення наведені з підручника Тіца (2) і можуть використовуватися як основні орієнтири.

Тільки результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Результати повинні співвідноситися з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб контроль здійснювався з кожною стандартною кривою. Статистично значуща кількість контролів повинна бути проаналізована для встановлення середніх значень та прийнятних діапазонів для забезпечення належного виконання.

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних та федеральних норм. Використання контролів як нормальних, так і в патологічних рівнів забезпечує щоденну достовірність результатів. Контролі та відповідні результати лабораторії з контролю якості зазначені у сертифікаті якості, доданому до набору. Значення та діапазони, зазначені на аркуші якості, завжди стосуються поточної партії комплекту і повинні бути використані для прямого порівняння результатів.

Також рекомендується використовувати національні або міжнародні програми оцінки якості для того, щоб забезпечити точність результатів.

Використовувати відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень та тенденцій. Якщо результати аналізу невідповідні до встановлених прийнятних діапазонів контрольних матеріалів результати пацієнтів слід вважати недійсними.

У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні області: пристрої для піпетування та синхронізації; фотометр, термін придатності реагентів, умови зберігання та інкубації, способи аспірації та промивання. Перевіривши вищезазначені товари, не виявивши помилок, зверніться до свого дистриб'ютора або виробника безпосередньо.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу - від 1,3 до 800 нг / мл

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Наступні речовини були випробувані на перехресну реакційну здатність аналізу:

стероїд	Перехресна реактивність (%)
кортизол	100
кортикостерон	45
прогестерон	9
деоксикортизол	< 2
дексаметазон	< 2
кортизон	0,9
естрон	< 0.01
естріол	< 0.01
тестостерон	< 0.01

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість ІФА для кортизолу була розрахована шляхом віднімання 2 стандартних відхилень від в середньому 20 повторних аналізів стандарту А і було встановлено, що становить 1,3 нг / мл

9.4 Точність

9.4.1 Варіація в аналізі

Варіабельність в аналізі показана нижче:

зразок	кількість	Значення (нг/мл)	CV (%)
1	20	43,5	8,1
2	20	226,5	3,2
3	20	403,6	5,6

9.4.2 Варіації між аналізами

Між аналізами показано нижче:

зразок	кількість	Значення (нг/мл)	CV (%)
1	32	53,7	6,7
2	32	208,4	7,7
3	32	359,3	6,5

9.4.3 Між лотами

Коливання між тестами (між партіями) визначали шляхом вимірювання кожного зразка 6 разів з 3 різними лотами наборів (n = 18)

зразок	кількість	Значення (нг/мл)	CV (%)
1	18	115,3	11,7
2	18	281,3	14,0
3	18	334,8	12,0
4	18	524,8	15,0

9.5 Відновлення

Зразки були підкріплені додаванням розчинів Кортизолу з відомими концентраціями.

Відновлення (%) обчислювали множенням співвідношення вимірюваних і очікуваних значень на 100.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація нг/мл	57,0	240,0	378,0
Середнє відновлення (%)	94,3	101,7	92,3
Діапазон від	86,0	95,0	91,0
Відновлення до	102,0	111,0	95,0

9.6. Лінійність

Зразки вимірювали нерозведеними та в серійних розведеннях зі стандартом А. Розраховували відновлення (%) шляхом множення співвідношення очікуваних і виміряних значень на 100.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Концентрація нг/мл	48,0	255,0	427,0
Середнє відновлення (%)	102,5	99,8	92,0
Діапазон від	92,0	93,0	89,0
Відновлення до	110,0	107,0	94,0

10. ОБМЕЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу буде виконана з повною розумінням інструкції, вкладеної в пакет набору та з дотриманням належної лабораторної практики. Будь-яке неправильне поводження зі зразками або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

10.1 Перешкоджаючі речовини

Гемоглобін (до 4 мг / мл), Білірубін (до 0,5 мг / мл) та Тригліцерид (до 7,5 мг / мл) не мають вплив на результати аналізу.

10.2 Вплив ліків

До сьогодні не відомі нам речовини (ліки), які впливають на вимірювання кортизолу у вибірці.

10.3 Ефект високої дози-Хук ефект.

Ефект високої дози-Хук-ефект не відомий для конкурентних аналізів.

11. ЮРИДИЧНІ АСПЕКТИ

11.1 Надійність результатів

Випробування необхідно проводити точно відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Більше того, користувач повинен суворо дотримуватися правил НЛП (Належної лабораторної практики) або інших застосованих національних стандартів та / або законів. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в процедуру випробування, достатню кількість контролів для перевірки точності тесту.

Результати випробувань дійсні лише в тому випадку, якщо всі контролі знаходяться у визначених діапазонах і якщо всі інші параметри тестування також знаходяться в межах заданих специфікацій аналізу. У разі будь-яких сумнівів чи занепокоєнь, будь ласка, зверніться до служби виробника.

11.2 Терапевтичні наслідки

Терапевтичні наслідки ніколи не повинні базуватися лише на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати тестування є у погодженні з пунктами, як зазначено у пункті 11.1. Будь-який лабораторний результат є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта.

Тільки у випадках, коли результати лабораторії прийнятно узгоджуються із загальною клінічною картиною, пацієнт повинен отримати терапевтичні наслідки.

Сам результат тесту ніколи не повинен бути єдиним визначальним фактором для отримання будь-яких терапевтичних наслідків.

11.3 Відповідальність

Будь-яка модифікація тестового набору та / або обмін або суміш будь-яких компонентів різних партій з одного тестовий набору для іншого може негативно вплинути на очікувані результати та обґрунтованість загального тесту. Такі модифікація та / або обмін визнають недійсними будь-які вимоги про заміну. Претензії, подані через помилкове тлумачення результатів лабораторії клієнтом відповідно до пункту 11.2. є також недійсними. Незалежно від того, у разі будь-якої претензії відповідальність виробника не повинна перевищувати значення вартості тестового набору. За будь-яку шкоду, заподіяну тест-набору під час транспортування, не несе відповідальності виробник.

12. ЛІТЕРАТУРА

1. L. Thomas, Labor und Diagnose, 4. Auflage, 1992
2. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Saunders, 1968

Умовні позначення:

 Температура зберігання	 Виробник	 Містить достатньо для <N> випробувань
 Дата закінчення терміну придатності	LOT Код партії	IVD Тільки для ін вітро діагностики в лабораторних умовах!
 Звертайтеся до інструкції по експлуатації	CONT зміст	CE Маркування
 Обережно	REF Каталожний номер	