

Інструкція

Кортизол ІФА сечі



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

REF**MS E-5100****IVD****CE**

1. ПЕРЕДБАЧУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Конкурентний імуноферментний колориметричний метод кількісного визначення концентрації вільного кортизолу в сечі.

Набір Кортизол сечі ІФА призначений лише для лабораторного використання.

1.2 Клінічне значення

Кортизол - це стероїдний гормон, який виділяється корою надниркових залоз у відповідь на гормон АКТГ (виробляється гіпофізом), він бере участь у реакції на стрес; він підвищує артеріальний тиск, рівень цукру в крові, може викликати безпліддя у жінок і пригнічує імунну систему.

Кортизол діє через специфічні внутрішньоклітинні рецептори та впливає на численні фізіологічні системи, включаючи імунну функцію, регуляцію протидії глюкози, тонус судин, утилізацію субстрату та метаболізм кісток. Кортизол виводиться головним чином із сечею у незв'язаному (вільному) вигляді.

У плазмі кортизол зв'язується з кортикостероїд-зв'язуючим глобуліном (CBG, транскотин) з високою афінністю та з альбуміном. Для більшості рецепторів доступний лише вільний кортизол.

Ці нормальні ендогенні функції є основою для фізіологічних наслідків хронічного стресу – тривала секреція кортизолу викликає виснаження м'язів, гіперглікемію та пригнічує імунні/запальні реакції. Такі ж наслідки виникають при тривалому прийомі глюкокортикоїдних препаратів.

Вільна фракція кортизолу являє собою метаболічно активний кортизол. У нормальних умовах менше 1% виводиться з сечею. При патологічних станах (синдром Кушинга) рівні вільного кортизолу в сечі підвищені, тому що ЦБГ не зв'язує плазматичний кортизол в надлишку і він виділяється з сечею.

Під час вагітності або лікування естро-прогестагенами спостерігається підвищення рівня кортизолу в плазмі, спричинене збільшенням виробництва транспортного білка, але рівень вільного кортизолу в сечі залишається нормальним, що свідчить про правильну функцію надниркових залоз.

Цей тест дуже корисний для оцінки реальної функції надниркових залоз, оскільки вимірюється метаболічно активна частина. Крім того, вимірювання вільного вмісту сечі є кращим параметром для діагностики синдрому Кушинга.

2. ПРИНЦИП

Кортизол (антиген) у зразку конкурує з антигенним кортизолом, кон'югованим з пероксидазою хрому (HRP), за зв'язування з обмеженою кількістю антитіл проти кортизолу, покритих мікропланшетом (тверда фаза).

Після інкубації виконується розділення зв'язаного/вільного за допомогою простого твердофазного промивання.

Потім фермент HRP у зв'язаній фракції реагує з субстратом (H₂O₂) і ТМБ-субстрат і розвиває синій колір, який змінюється на жовтий, коли стоп-розчин (H₂SO₄) додається. Інтенсивність кольору обернено пропорційна концентрації кортизолу в зразку.

Концентрація кортизолу в зразку розраховується за стандартною кривою.

3. РЕАКТИВИ, МАТЕРІАЛИ ТА ПРИЛАДИ**4. 3.1 Реагенти та матеріали, що входять до набору**

Стандарти і контролю

Кат.№	Стандарт	Концентрація нг/мл	Об'єм / флакон
MS E-5101	Стандарт А	0	4 мл
MS E-5102	Стандарт Б	1	1 мл
MS E-5103	Стандарт С	5	1 мл
MS E-5104	Стандарт Д	30	1 мл
MS E-5105	Стандарт Е	200	1 мл
MS E-5151	Контроль 1 *	Зверніться до етикеток флаконів або QC-	
MS E-5152	Контроль 2 *	Звіт про очікувану вартість і прийнятний діапазон!	

* Контроль: готовий до використання

MS E-5140**Кон'югат**

Зміст: Кортизол, кон'югований з пероксидазою хрому (HRP)

обсяг: 1 x 33 мл

MS E-5131**Лунки мікропланшета**

Зміст: Мікропланшет, що розбивається; Антитіла проти кортизолу, адсорбовані на мікропланшеті.

MS E-0030**Промивний розчин 10x**

Зміст: Фосфатний буфер 0,2 М, Проклін < 0,0015%.

обсяг: 1 x 50 мл

MS E-0055**Розчин субстрату**

Зміст: H_2O_2 -ТМВ, 0,26 г/л (уникати контакту зі шкірою).

обсяг: 1 x 15 мл

MS E-0080**Стоп розчин**

Зміст: Сірчана кислота, 0,15 моль/л (уникати контакту зі шкірою).

обсяг: 1 x 15 мл

Ідентифікація
небезпеки:



H290 Може викликати корозію металів.

H314 Викликає серйозні опіки шкіри та пошкодження очей.

3.2 Необхідні реагенти не постачаються

Дистильована вода

3.3 Допоміжні матеріали та прилади

Автоматичний дозатор

Рідер мікропланшетів (450 нм, 620 – 630 нм)

Примітка

Зберігайте всі реагенти при 2 °C – 8 °C у темряві.

Відкривайте пакет з мікропланшетом з покриттям, лише коли він набув кімнатної температури, і закривайте одразу після використання.

Після відкриття мікропланшет стабільний до закінчення терміну придатності набору.

4. ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей набір призначений для використання in vitro лише професійними особами. Не для внутрішнього чи зовнішнього використання в людей або Тварин.
- Під час роботи з наданими реагентами використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту.
- Дотримуватися належної лабораторної практики (НЛП) f поведження з продуктами крові.
- Матеріал тваринного походження, використаний для приготування набору, було отримано від тварин, які сертифіковані як здорові, а бичачий білок був отриманий з країн, не інфікованих BSE, але ці матеріали слід розглядати як потенційно інфекційні.
- Деякі реагенти містять невелику кількість Proclin 300 як консервант. Уникайте контакту зі шкірою або слизовими.
- Субстрат ТМБ містить п подразник, який може бути шкідливим при вдиханні, проковтуванні або поглинанні через шкіру. Щоб запобігти травмам, уникайте вдихання, проковтування або контакту зі шкірою та очима.
- Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота є отруйною та корозійною, а також може бути токсичною при попаданні всередину. Щоб запобігти хімічним опікам, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте впливу реагенту ТМБ/ H_2O_2 спрямованого сонячного світла, металів або окислювачів. Не заморожуйте розчин.
- Цей метод дозволяє визначати кортизол від 0,47 нг/мл до 200 нг/мл.
- Клінічна значущість визначення кортизолу може бути недейсною, якщо пацієнт отримував лікування кортикостероїдами або природними або синтетичними стероїдами.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Будь ласка суворо дотримуйтеся послідовності етапів дозування, наведених у цьому протоколі. Наведені тут дані про ефективність отримано з використанням конкретних реагентів, перелічених у цій інструкції з використання.
- Усі реагенти слід зберігати в холодильнику при температурі 2 °C – 8 °C в оригінальній упаковці. Будь-які винятки чітко вказані. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності за умови зберігання та поведження відповідно до вказівок.
- Дайте всім компонентам набору та зразкам досягти кімнатної температури (22 °C – 28 °C) і добре перемішайте перед використанням.
- Не замінюйте компоненти комплекту з різних партій. Необхідно дотримуватися терміну придатності, зазначеного на етикетках коробок і флаконів. Не використовуйте компоненти набору після закінчення терміну придатності.
- Якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, користувач несе відповідальність за те, щоб комплект пройшов відповідні випробування.
- Версія: 13.0a Чинний: 2023-01-25

- Неповне або неточне видалення рідини з лунок може вплинути на точність аналізу та/або збільшити фон.
Для підвищення продуктивності комплекту на автоматичних системах рекомендується збільшити кількість промивок.
- Важливо, щоб час реакції в кожній лунці підтримувався постійним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно тривати більше десяти хвилин, щоб уникнути дрейфу аналізу. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуйтеся того самого порядку дозування. Якщо використовується більше одного планшета, рекомендується повторити криву доза-відповідь у кожному планшеті.
- Додавання розчину субстрату ТМБ ініціює кінетичну реакцію, яка припиняється додаванням стоп-розчину. Таким чином, субстрат ТМБ і стоп-розчин слід додавати в тій же послідовності, щоб усунути будь-які відхилення часу під час реакції.
- Дотримуйтеся вказівок щодо виконання контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контрольних зразків.
- Для відновлення та дозування реагентів потрібна максимальна точність.
- Зчитувачі планшетів вимірюють вертикально. Не торкайтеся дна лунок.

6. **ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ**

Зберігайте набір при 2 °С – 8 °С; набір стабільний до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці набору та у звіті про контроль якості.

Не використовуйте набір або його компоненти після закінчення терміну придатності.

7. **ПРОЦЕДУРА**

7.1 Підготовка стандарту та контролю

Перед використанням залишити на 5 хвилин на обертовому міксері.

Стандарти готові до використання і мають таку концентрацію кортизолу:

	Стандарт А	Стандарт Б	Стандарт С	Стандарт D	Стандарт Е
нг/мл	0	1	5	30	200

Контролі готові до використання.

Після відкриття стандарти та контролі стабільні 6 місяців при температурі 2 °С – 8 °С.

7.2 Приготування кон'югату

Кон'югат готовий до використання.

Після відкриття він стабільний 6 місяців при температурі 2 °С – 8 °С.

7.3 Підготовка зразка

Визначення кортизолу за допомогою цього набору слід проводити у зразках сечі.

Важливе зауваження: Набір розроблено для використання на необроблених зразках сечі; підкислення сечі, яке призвело до значень b низьких 5,0, може завадити аналізу та призвести до відхилень у результатах.

Зразок розбавляти не потрібно.

Загальний об'єм сечі, виділеної за 24 години, необхідно зібрати та змішати в одній ємності.

Зразки сечі, які не підлягають негайному аналізу, слід зберігати при 2 °С – 8 °С або при -20 °С протягом більш тривалого періоду часу (максимум 6 місяців).

Зразки з концентрацією понад 200 нг/мл не розбавляти; такі зразки повинні бути повідомлені як "> 200 нг/мл".

7.4 Підготовка промивного розчину

Розведіть вміст флакона концентрату «Wash Solution» 10X дистильованою водою до кінцевого об'єму 500 мл до

Для менших об'ємів дотримуйтеся співвідношення розведення 1:10.

Розведений промивний розчин стабільний протягом 30 днів при 2 °С – 8 °С.

У концентрованому промивному розчині можна спостерігати наявність кристалів; в цьому випадку перемішувати при кімнатній температурі до повного розчинення кристалів; для більшої точності розведіть всю пляшку концентрованого промивного розчину до 500 мл, стежачи за тим, щоб повністю перенести кристали, потім перемішайте, поки кристали повністю не розчиняться.

7.5 Процедура

Дайте всім реагентам нагрітися до кімнатної температури (22 °C – 28 °C) принаймні на 30 хвилин.

Невикористані стріпи з мікролунками з покриттям слід надійно помістити в пакет із фольги, що містить осушувач, і зберігати при температурі 2 °C – 8 °C.

Щоб уникнути можливого мікробного та/або хімічного забруднення, невикористані реагенти ніколи не слід переносити в оригінальні флакони.

Оскільки для підвищення точності результатів тесту необхідно виконати визначення в двох примірниках, підготуйте дві лунки для кожної точки стандартної кривої (А – Е), дві для кожного контролю, дві для кожного зразка, одну для холостого зразка.

Реагент	Стандарти	Зразки/контролі	Пустий
Стандарт А – Е	10 мкл		
Зразки/контролі		10 мкл	
Сполучений	300 мкл	300 мкл	
Інкубуйте при 37 °C протягом 1 години.			
Видаліть вміст з кожної лунки; промийте лунки 3 рази 350 мкл розчину			промивний розчин.
Важлива примітка: під час кожного етапу миття обережно струшуйте планшет протягом 5 секунд і видаліть надлишок розчину, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому паперовому рушнику. Автоматична промивна машина: якщо ви використовуєте автоматичну промивну машину, <u>рекомендується виконати 6 етапів промивання.</u>			
Розчин субстрату	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубуйте при кімнатній температурі (22 °C – 28 °C) протягом 15 хвилин у темряві			
Стоп розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл

Обережно струсіть мікропланшет. Зчитайте поглинання (Е) при 450 нм проти еталонної довжини хвилі 620–630 нм або проти бланка протягом 5 хвилин.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контрольні зразки на нормальному, високому та низькому рівнях кортизолу в сечі для моніторингу ефективності аналізу. Ці контролі слід розглядати як невідомі, а значення визначати в кожній виконаній процедурі тестування. Для відстеження ефективності наданих реагентів слід підтримувати таблиці контролю якості. Для встановлення тенденцій слід використовувати відповідні статистичні методи. Окрема лабораторія повинна встановити допустимі межі ефективності аналізу. Інші параметри, які слід контролювати, включають 80, 50 і 20% перетинів стандартної кривої для відтворюваності серії. Крім того, максимальна абсорбція повинна відповідати минулому досвіду. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про непомічену зміну умов експерименту або погіршення якості реагентів набору.

9. РЕЗУЛЬТАТИ

9.1 Середня абсорбція

Обчисліть середнє значення абсорбції (Em) для кожної точки стандартної кривої та кожного зразка.

9.2 Стандартна крива

Побудуйте графік значення абсорбції (Em) стандартів (А – Е) від концентрації. Накресліть криву, яка найкраще підходить, через нанесені точки (наприклад, логістика чотирьох параметрів).

9.3 Підрахунок результатів

Інтерполуйте значення зразків на стандартній кривій, щоб отримати відповідні значення концентрацій, виражені в нг/мл.

Щоб розрахувати концентрацію кортизолу в сечі, обчисліть, як зазначено вище, і виправте загальний об'єм сечі, зібраної за 24 години:

$$\text{нг/мл} \times \text{Об'єм (мл) сечі 24 год} / 1000 = \text{мкг кортизолу/24 год}$$

10. РЕФЕРЕНТНІ ЗНАЧЕННЯ

Щоб визначити діапазон норми для зразків сечі, було протестовано 128 очевидно здорових дорослих чоловіків і жінок.

Результат:

Нормальний діапазон сечі (24 години)
1,5 мкг/24 год – 63 мкг/24 год

11. ПРОДУКТИВНІСТЬ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ

11.1 Аналітична чутливість

Аналітичну чутливість досліджували за допомогою LOB (межа холостого виміру), LOD (межа виявлення), LOQ (межа кількісного визначення) та аналітичної чутливості (AS).

У наступній таблиці наведено критерії дослідження та отримані результати.

	Критерії	Результати (нг/мл)
LOB	Було досліджено 60 реплікатів стандарту А, використаного як «бланк». 5 різних занять протягом 3 днів	0,28
LOD	Досліджено 6 проб сечі з низьким вмістом кортизолу більше 10 аналізів у дублікатах, виконаних через 5 днів.	0,47
LOQ	Досліджено 6 проб сечі з низьким вмістом кортизолу більше 10 аналізів у дублікатах, виконаних через 5 днів	0,56
AS	Було зроблено 20 реплікатів стандарту А та реплікатів стандарту В проаналізовано. AS був розрахований шляхом лінійної регресії.	0,22

11.2 Точність і відтворюваність (комплексна точність)

Точність і відтворюваність оцінювали за допомогою 6 різних зразків сечі з різною концентрацією кортизолу.

У наведеній нижче таблиці наведено показник CV у Інструкції межах циклу та загальний CV%.

Зразок	п	Середнє (нг/мл)	W h CV % пробігу	Загальний CV%
PS 2	20	112,141	6,6%	12%
PS 4	20	64,563	8,1%	12%
СТ Високий	20	50,577	7,3%	11%
PS 5	20	25,878	7,6%	10%

11.3 Аналітична специфічність

PS 6	20	9,269	7,6%	11%
СТ Низький	20	3,438	7,0%	9%

Вплив альбуміну, ацетилсаліцилової кислоти, ібупрофену та аскорбінової кислоти досліджували шляхом додавання речовини, що заважає, до зразка сечі з низькою та високою концентрацією кортизолу, а також шляхом порівняння його концентрації із зразком без добавки.

Втручання було оцінено як «значне», якщо воно викликає похибку концентрації > 10% між стрибками і зразком без добавки.

У наведеній нижче таблиці показано

отримані результати:

Речовина	в	Концентрація	Втручання
Альбумін		5 мг/дл	Немає
Ацетилсаліцилова кислота		3,62 ммоль/л	Немає
Ібупрофен		2,42 ммоль/л	Немає
Аскорбінова кислота		5 мг/л	Немає

Висновок: альбумін, ацетилсаліцилова кислота, ібупрофен та аскорбінова кислота не впливають.

11.4 Кореляція

137 зразків сечі досліджено за допомогою набору Кортизол сечі ІФА та методом РХ-МС (посилання) Крива лінійної регресії:

$$y = 1,008x - 0,5019$$
$$r^2 = 0,83$$

12. ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Реагенти необхідно утилізувати відповідно до місцевих правил.

13. БІБЛІОГРАФІЯ

1. Фостер, LB і Данн, RT Clin. Chem. 20/3 365 (1974)
2. Де Ласерда та ін. Дж. Клін. Ендокр. і Metab. 36 227 (1973)
3. Rolleri, E., et al Clin. Чим. Acta 66 319 (1976)
4. Kobayashi, Y., et al Steroids, 32 no 1 (1978)
5. Akarawa, et al Anal. біохім. 97 248 (1979)

14. ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМ

ПОМИЛКИ / МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ / ПРОПОЗИЦІЇ

Колориметрична реакція відсутня

- кон'югат не піпетований
- забруднення кон'югатів та/або субстрату
- помилки у виконанні процедури аналізу (наприклад, випадкове піпетування реагентів у неправильній послідовності або з неправильного флакона тощо)

Занадто низька реакція (занадто низькі ОГ)

- неправильний кон'югат (наприклад, не з оригінального набору)
- час інкубації занадто короткий, температура інкубації занадто низька

Занадто висока реакція (занадто високі ОГ)

- неправильний кон'югат (наприклад, не з оригінального набору)
- час інкубації занадто довгий, температура інкубації занадто висока
- якість води для промивного буфера недостатня (низький ступінь деіонізації)
- недостатнє промивання (неправильно видалені кон'югати)

Незрозумілі викиди

- забруднення піпеток, наконечників або контейнерів
- недостатнє промивання (неправильно видалені кон'югати)

занадто високий CV% у межах серії

- реагенти та/або смужки, попередньо не нагріті до кімнатної температури перед використанням
- посудомийна машина не промивається належним чином (пропозиція: очистіть головку мийки)

занадто високий CV% між циклами

- умови інкубації непостійні (час, температура)
- контролі та зразки не розподіляються одночасно (з однаковими інтервалами) (перевірте порядок дозування)
- особистісні варіації

Символи:

	Температура зберігання		Виробник		Містить достатньо для <n> тестів
	Термін придатності		Код партії		Для діагностики in vitro використовувати тільки!
	Зверніться до інструкцій для використання		Зміст		Маркування CE відповідність
	Обережно		Каталожний номер		Дистриб'ютор
	Дата виготовлення				