

Кортизол сечі ІФА

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення
Кортизолу в сечі

REF RE52241

 **96**

   **2-8°C**

EU: **IVD** **CE** 



I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Гамбург, Німеччина

Телефон: +49 (0)40-53 28 91-0
Факс: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,
тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Кортизол сечі ІФА є конкурентним імуноферментним колориметричним методом для кількісного визначення концентрації вільного кортизолу в сечі. Кортизол сечі призначений тільки для лабораторного використання .

2 КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Кортизол є стероїдним гормоном, який виділяється з кори надниркових залоз у відповідь на гормон АКТГ (виробляється гіпофізом), він бере участь у відповіді на стрес; він підвищує кров'яний тиск, рівень цукру в крові, може призвести до безпліддя у жінок, і пригнічує імунну систему.

Кортизол діє через специфічні внутрішньоклітинні рецептори і має ефекти в численних фізіологічних системах, включаючи імунну функцію, лічильник глюкозо-регулювання, судинний тонус, використання субстрату і кістковий метаболізм. Кортизол виводиться з організму переважно з сечею в нез'язаній (вільній) формі. Кортизол пов'язаний, в плазмі крові, з кортикостероїд-пов'язаним глобуліном (ЦБГ, транскотин), з високою спорідненістю, і з альбуміну.

Тільки вільний кортизол доступний для більшості рецепторів.

Ці нормальні ендogenousні функції є основою для фізіологічних наслідків хронічного стресу-тривала секреція кортизолу викликає м'язові втрати, гіперглікемію, і пригнічує імунні / запальні реакції.

Ті ж наслідки виникають в результаті тривалого використання глюкокортикоїдних препаратів.

Фракція вільного кортизолу представляє собою метаболічно активний кортизол. У нормальних умовах, менше 1% виділяється з сечею. У патологічних станах (синдром Кушинга) рівні вільного кортизолу в сечі зростають, тому що ЦБГ не пов'язує кортизол плазми в надлишку, і це видаляється з сечею.

Під час вагітності або ЕСТРО - прогестагенового лікування збільшення кортизолу плазми викликано збільшенням виробництва транспортного білка, але нормальний результат рівнів вільного кортизолу в сечі вказують на правильне функціонування наднирників.

Цей тест дуже корисний для оцінки реальної функції надниркових залоз, так як він вимірює вільний кортизол, це метаболічно активна форма. Крім того, вимірювання вільного кортизолу в сечі є найкращим параметром для діагнозу Синдрому Кушинга.

3 ПРИНЦИП

Кортизол (антиген) в зразку конкурує з антигенним кортизолом, кон'югованим з пероксидазою хрому (HRP), для зв'язування з обмеженою кількістю антитіл анти кортизол, нанесеними на мікропланшет (тверда фаза). Після інкубації розділення пов'язане / вільне здійснюється за допомогою простого промивання твердої фази. Потім фермент HRP з пероксидазою хрому в пов'язаній фракції реагує з субстратом (H₂O₂) і субстратом ТМБ і розвиває блакитний колір, який змінюється в жовтий, коли додається стоп-розчин (H₂SO₄).

Інтенсивність кольору обернено пропорційна концентрації кортизолу в зразку.

Концентрація кортизолу в зразку розраховують по калібрувальній кривій.

4 РЕАГЕНТИ, МАТЕРІАЛИ ТА ІНСТРУМЕНТАРІЙ

4.1 Реагенти та матеріали, що постачаються в наборі

1. Покритий мікропланшет МТР (1 мікропланшет розбірний)

Анти - Кортизол IgG адсорбований на мікропланшет

2. Кон'югат CONJ 1 x 33 мл

Кортизол -HRP кон'югат

3. Кортизол Стандарт 0 CAL 0 1 x 4 мл

4. Стандарти Кортизол 1 - 4 CAL 1-4 1 x 4 x 1 мл

5. Промивний буфер washbuffer (10x) 1 x 50 мл

Фосфатний буфер, проклін <0,0015%

6. ТМБ Субстрат TMB SUBS 1 x 15 мл

H₂O₂-ТМБ 0,26 г / л (уникати будь-якого контакту зі шкірою)

7. Стоп-розчин STOP 1 x 15 мл

Сірчана кислота 0,15 моль / л (корозійні: уникати будь-якого контакту зі шкірою)

8. Контроль низький CONTROL LOW 1 x 1 мл

9. Високий контроль CONTROL HIGH 1 x 1 мл

4.2 Реагенти необхідні, які не постачаються

Дистильована вода.

4.3 Допоміжні матеріали та прилади

Автоматичний дозатор.

ІФА рідер мікропланшетів (450 нм, 620-630 нм)

Примітки

Зберігати всі реагенти при 2 ° С до 8 ° С в темряві.

Відкрийте пакет з мікропланшетом тільки тоді, коли він перебуває при кімнатній температурі і закрийте відразу після використання. Одного разу відкритий, мікропланшет стабільний до кінця терміну придатності набору.

5 ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей набір призначений для використання in vitro тільки професійними особами. Не для внутрішнього або зовнішнього використання в організмі людини або тварин.
- Використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту при роботі з передбаченими реагентами.
- Дотримуйтесь належної лабораторної практики (НЛП) для обробки продуктів крові.
- Деякі реагенти містять невелику кількість проклін 300 в якості консерванту. Уникайте контакту зі шкірою або слизовою оболонкою.
- ТМБ субстрат містить подразник, який може завдати шкоди при вдиханні, ковтанні або всмоктується через шкіру. Щоб уникнути травм, уникайте вдихання, проковтування або контакту зі шкірою та очима.
- Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота є отруйною та корозійною і може бути токсична при попаданні в організм. Щоб уникнути хімічних опіків, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте взаємодії реагенту ТМБ / H₂O₂ з спрямованим сонячним світлом, металами або оксидантами. Не заморожувати розчин.
- Цей метод дозволяє визначати кортизол від 0,47 нг / найнижча ОГ) (найнижча ОГ до 200 нг /мл.)
- Клінічна значимість визначення кортизолу може бути визнана недійсною, якщо пацієнт приймав лікування кортикостероїдами або натуральними або синтетичними стероїдами.

6 ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

- Будь- ласка, виконуйте послідовність кроків піпетування, передбачену в цьому протоколі. Дані про продуктивність,представлені тут були отримані з використанням специфічних реагентів, перерахованих у цій Інструкції по застосуванню.
- Всі реагенти повинні зберігатися в холодильнику при температурі 2-8 ° с в оригінальній упаковці. Будь-які винятки явно позначені. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності при зберіганні і використанні згідно позначенням.
- Дозволити всім компонентам набору і зразкам досягти кімнатної температури (22-28 ° С) і добре перемішати для використання.
- не обмінювати компоненти набору з різних серій. Термін придатності, надрукований на коробці і етикетках флаконів, повинен бути прочитаний. Не слід використовувати будь-який компонент набору після закінчення терміну дії.
- при використанні автоматизованого обладнання, користувач несе відповідальність за впевненість, що набір був належним чином протестований.
- неповне або неточне видалення рідини з лунок може вплинути на точність аналізу і / або збільшення фону. Для підвищення продуктивності комплекту на автоматичних системах рекомендується збільшити кількість циклів промивання.
- важливо, щоб час реакції в кожній лунці був постійним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно виходити за межі десяти хвилин, щоб уникнути зсуву результатів тесту. Якщо потрібно більше 10

хвилин, дотримуватися такого ж порядку розподілу. Якщо більш ніж один планшет використовується, рекомендується повторити калібрувальну криву для кожного планшету.

- додавання розчину субстрату ТМБ ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп-розчину. Тому ТМБ субстрат і стоп розчин слід додавати в тій же послідовності, щоб усунути будь-яке відхилення під час реакції.

- Дотримуйтесь рекомендації для виконання контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контрольних зразків.

- Максимальна точність необхідна для відновлення і розподілу реагентів.

- Планшетний рідер вимірює вертикально. Не торкайтесь нижньої частини лунок.

7 ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Зберігають набір при температурі 2-8 ° С; комплект є стабільним до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці комплекту та в сертифікаті аналізу.

Не використовуйте комплект або його компоненти після закінчення терміну придатності

8.ПРОЦЕДУРА

8.1 Підготовка калібраторів (CAL 0 - 4 CAL) та контролів

Перед використанням, залиште на 5 хвилин на обертовому міксері.

Калібратори для використання мають наступну концентрацію кортизолу:

	CAL 0	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4
Нг/мл	0	1	5	30	200

Контролі готові для використання.

Після відкриття калібратори та контролі зберігають стабільність до 6 місяців при 2-8 ° С.

8.2. Приготування кон'югату

Кон'югат готовий до використання.

Після відкриття він стабільний протягом 6 місяців при 2-8 ° С.

8.3 Підготовка зразку.

Визначення кортизолу за допомогою цього набору повинне бути виконане в зразках сечі .

Важлива примітка:

набір призначений для використання з необроблених зразків сечі; процедура підкислення сечі що призводить рН до значень нижче 5,0, може перешкоджати аналізу і викликати незрозумілі результати.

Не потрібно розбавляти зразок.

Загальний об'єм сечі, який виділяється протягом 24 годин, слід збирати та змішувати в одному контейнері.

Зразки сечі, які не повинні аналізуватися негайно, слід зберігати при 2-8 ° С або на -20 ° С протягом більш тривалого періоду (максимум 6 місяців).

Зразки з концентрацією більше 200 нг / мл не слід розбавляти; такі зразки повинні повідомлятися як «> 200 нг/мл».

7.4 Підготовка промивного розчину.

Розчинити зміст кожного флакона "10X конц. Промивний розчин" дистильованою водою до кінцевого об'єму 500 мл перед вживанням. Для менших обсягів дотримуватися співвідношення 1:10 при розведенні.

Розведений розчин для промивання стабільний протягом 30 днів при температурі 2-8 ° С. В концентрованому миючому розчині можна спостерігати присутність кристалів, в цьому випадку змішати при кімнатній температурі до повного розчинення кристалів, для більшої точності, розбавте цілу пляшку концентрованого розчину для промивання до 500 мл , піклуючись, щоб передати повністю кристали, а потім перемішати до повного розчинення кристалів.

7.5 Процедура

- Дозволити всім реагентам досягти кімнатної температури (22-28 ° C) щонайменше 30 хв. В кінці аналізу, зберігати негайно реагенти при 2-8 ° C : уникати тривалого впливу кімнатної температури
- Невикористані стріпи мікропланшету слід помістити надійно в пакет з фольги, що містить осушувач і зберігати при 2-8 ° C.
- щоб уникнути потенційного мікробного і / або хімічного забруднення, залишки невикористаних реагентів ніколи не повинні бути переміщені в оригінальні флакони.
- Так як необхідно виконувати визначення в двох примірниках, для того, щоб підвищити точність результатів випробувань, приготуйте дві лунки для кожної точки кривої калібрування (CAL 0 - 4 CAL), дві для кожного контролю, дві для кожного зразка, одну для порожньої (бланк).

	Стандарти/контролі	зразок	Порожня (бланк)
Стандарти CAL 0 –CAL 4 контроль	10 мкл	-	-
зразок	-	10 мкл	-
Кон'югат	300 мкл	300 мкл	-
Інкубуйте при 37 ° C протягом 1 години. Видаліть вміст із кожної лунки. Промити лунки 3 рази 350 мкл розчиненого промивного розчину. Важливе зауваження: під час кожної промивної операції обережно струшуйте планшет протягом 5 секунд і видаліть надлишок розчину, натискаючи перевернутим планшетом на абсорбуючий паперовий рушник. Автоматична промивка: якщо ви використовуєте автоматичну систему для промивки, рекомендується виконати 6 процедур миття.			
ТМБ субстрат	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубувати при кімнатній температурі (22°C ДО 28°C) на протязі 15 хвилин в темряві			
Стоп-розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Мікропланшет струсіть м'яко. Прочитайте абсорбцію при 450 нм відносно еталонної довжини хвилі 620-630 нм або проти порожньої (бланк) протягом 5 хв.			

9. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна аналізувати контролі нормальних, високих і низьких рівнів діапазону Кортизолу сечі для моніторингу виконання аналізу. Ці контролі повинні розглядатися в якості невідомих і значень, визначених в кожному виконанні тест-процедури. Графіки контролю якості повинні бути збережені для характеристик реагентів, що постачаються. Доречні статистичні методи повинні бути використані для встановлення тенденцій. Кожна лабораторія повинна встановити прийнятні межі виконання аналізу. Інші параметри, які слід контролювати включають 80, 50 і 20% відрізків стандартної кривої для прогону-до-прогону відтворюваності. Крім того, максимальна оптична густина повинна відповідати минулому досвіду. Значне відхилення від показників вказує на непомічену зміну в експериментальних умовах або деградацію реагентів набору. Свіжі реагенти повинні бути використані для визначення причини відхилень.

10 РЕЗУЛЬТАТИ

10.1 Середня абсорбція

Розрахуйте середнє значення оптичної густини для кожної точки калібрувальної кривої і кожного зразка.

10.2 Калібрувальна крива

Нанесіть значення оптичної густини калібраторів в залежності від концентрації. Намалюйте найбільш підходящу криву через накреслені точки (ES: чотири параметри логістики) .

10.3 Розрахунок результатів

Інтерполуйте значення зразків на калібрувальній кривій, щоб отримати відповідні значення концентрацій, вираженої в нг / мл. Розрахуйте концентрацію кортизолу в сечі, розрахувати, як описано вище або змінійте для загального обсягу або обсягу сечі зібраного протягом 24 годин: $\text{нг / мл} \times \text{Обсяг (мл) сечі 24 год} / 1000 = \text{мкг Кортизол} / 24\text{г}$

11. Референтні значення

Для визначення нормального діапазону для зразків сечі було 128 здорових дорослих чоловіків і жінок.

Нормальний діапазон сечі 24 г
1,5-63 мкг/24г

12. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

12.1 Аналітична чутливість

Аналітичну чутливість досліджували через LOB (межу порожньої, бланк), LOD (межа виявлення), LOQ (межа кількісного визначення) і аналітична чутливість (А.Ч.).

Наступна таблиця показує критерії дослідження та отримані результати.

Критерії		Результат (нг/мл)
Межа порожньої, бланк	60 повторів Cal 0, використаних як порожня «Бланк», були досліджені в 5 різних сеансах протягом 3 днів	0,28
межа виявлення	6 зразків сечі з низькою концентрацією кортизолу досліджують понад 10 аналізів у двох примірниках, виконаних через 5 днів	0,47
межа кількісного визначення	6 зразків сечі з низькою концентрацією кортизолу мають бути досліджені понад 10 аналізів у двох примірниках, виконаних через 5 днів	0,56
аналітична чутливість	Було проведено 20 повторів Cal 0 і 5 повторів Cal 1 було проаналізовано. А.Ч. розраховано за допомогою лінійної регресії	0,22

12.2 Точність і відтворюваність (комплексна точність)

Точність і відтворюваність оцінювали за допомогою 6 різних зразків сечі з різними концентраціями кортизолу. У наведеній нижче таблиці наведено показник Внутрішнього виконання та загального CV%.

зразок	кількість	Середнє (нг/мл)	CV% в прогоні	CV% загальна
ПЗ2	20	112,141	6,6%	12%
ПЗ4	20	64,563	8,1%	12%
контроль високий	20	50,577	7,3%	11%
ПЗ5	20	25,878	7,6%	10%
ПЗ6	20	9,269	7,6%	11%
контроль низьк.	20	3,438	7,0%	9%

12.3 Аналітична специфічність

12.3.1 Впливаючі речовини

Втручання альбуміну, ацетилсаліцилової кислоти, ібупрофену та аскорбінової кислоти вивчали шляхом додавання впливаючих речовин до зразків сечі з низькою і високою концентрацією кортизолу і шляхом порівняння його концентрації з незбагаченою пробєю.

Інтерференцію оцінювали як "істотну", якщо вона викликає зміщення концентрації > 10% між збагаченим і незбагаченим зразком.

Наступна таблиця показує отримані результати:

речовини	концентрація	вплив
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: не було виявлено жодних перешкод для альбуміну, ацетилсаліцилової кислоти, ібупрофену та аскорбінової кислоти.

12.4 Точність

12.4.11 Перехресна реактивність

Перехресна реакція антитіла, розрахована при 50% відповідно за Авраамом, приведена в таблиці:

реагент	Перехресна реактивність
кортизол	100%
Преднізолон	46,2%
11-дезоксикортизола	4%
Кортизон	3,69%
Преднізон	3,10%
11аОН Прогестерон	1%
Прогестерон	<0,1 %
альдостерон	<0,1 %
Прегненолон	<0,1 %
17β Естрадіол	<0,1 %
естрон 3-solfato	<0,1 %
естріол	<0,1 %
тестостерон	<0,1 %
спіронолактон	<0,1 %
DHEA	<0,1 %

ДНЕА-S	<0,1 %
Андростендіон	<0,1 %
андростерон	<0,1 %
ДНТ	<0,1 %
даназол	<0,1 %
холестерін	<0,1 %
дексаметазон	<0,1 %

12.5 Кореляція

137 проб сечі тестували за допомогою ІФА – тест кортизолу та з методом LC-MS (посилання)

Крива лінійної регресії:

$$Y = 1,008X - 0,5019$$

$$r^2 = 0,83$$

13 УПРАВЛІННЯ ВІДХОДАМИ

Реагенти повинні бути утилізовані відповідно до місцевих правил.

13. ЛІТЕРАТУРА

1. Foster, L.B. and Dunn, R.T. Clin Chem: 20/3, 365 (1974)
2. De Laceda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J. J. Clin Endocr. and Metab: 36:227 (1973)
3. Rolleri, E., Zannino, M., Orlandini, S., Malvano, R. Clin chim Acta 66 319 (1976)
4. Kobayashi, Y., et al. Steroids, 32 no. 1 (1978)
5. Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A. Anal. Biochem. 97248 (1979)

15 УСУНЕННЯ НЕПОЛАДОК

МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ ПОМИЛОК/ ПРОПОЗИЦІЇ

Немає колориметричної реакції

- відсутність кон'югованої реакції піпетування після додавання
- забруднення кон'югатів та / або субстрату
- помилки при виконанні процедури аналізу (наприклад, випадкове пвпетування реагентів в неправильній послідовності або з неправильного флакона тощо)

Занадто низька реакція (занадто низький рівень ОГ)

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









Занадто висока реакція (занадто висока ОГ)

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

Незрозумілі відхилення

- забруднення піпеток, наконечників або контейнерів
- недостатнє промивання (кон'югати неправильно видалені) занадто високі в межах циклу
- реактиви та / або стріпи, не нагріті попередньо до CV% кімнатної температури перед використанням
- вошер мікропланшетів не правильно миє (пропозиція: очистити головку вошера)
- занадто високі між-пробігами - інкубаційні умови не постійні (час, CV% температура)
- контролі та зразки, не розподіляються одночасно (з однаковими інтервалами) (перевірте порядок піпетування)
- варіації, пов'язані з особою


УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати подалі від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред'явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОВОГО (-ИХ) НАБОРУ (ІВ) . ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

	IBL International GmbH	Тел .:	+ 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
	Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург, Німеччина	E-MAIL:	IBL@IBL-International.com
		WEB:	http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua, www.ivset.ua