

# НАБІР РЕАГЕНТІВ

## КОРТИЗОЛ ELISA

### Cortisol ELISA

Каталог. №: **EIA-1887**

Дата випуску інструкції: **2019/05**  
Версія **12.0**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

#### 1. ВСТУП

##### 1.1 Призначення

**DRG Cortisol ELISA** – це ферментний імуноаналіз для кількісного *in vitro* діагностичного вимірювання Кортизолу у сироватці та плазмі (ЕДТА, гепарин- або цитратній плазмі).

##### 1.2 Короткий опис та пояснення

Кортизол (гідрокортизон, складовий F) є основним кортикостероїдом, який секретується в людині адренальними залозами. Це стероїдний гормон масою 363.5.

У більшості фізіологічних умов, лише приблизно 10% кортизолу в плазмі циркулює незв'язаним від транскортину у альбуміну.

Між продуктами людських адренальних залоз тільки кортизол є залученим в регулюванні секреції АКГТ.

Коли рівень вільного (не зв'язаного з білками) кортизолу в крові підвищується, звільнення АКГТ гальмується негативним зворотнім ефектом. І навпаки, якщо рівень кортизолу є субнормальним, негативний зворотній зв'язок зменшується, рівень АКГТ зростає і адренальні залози секретують кортизол доти, поки нормальний рівень в крові не відновиться.

Звільнення АКГТ є під контролем гіпоталамічного кортикотрофін-рилізинг гормону (CRH); система негативного зворотнього зв'язку, включаючи кортизол, наявна в двох гіпоталамічних і пітуїтарних рівнях (1).

Зазвичай, на протязі дня, коливання кортизолу досягає найвищого рівня зранку і найнижчого вночі. Корисну інформацію можна отримати тоді, коли виміри кортизолу будуть зроблені в фіксований час (наприклад, 8,00 год. ранку).

Основними біологічними ефектами кортизолу є: підвищення глюконеогенезису; відкладення глікогену в печінці; збільшення в крові концентрації глюкози, коли використання карбогідрату завершено; діє також на жировий метаболізм; а також протизапальна дія.

Вимірювання кортизолу є важливим для оцінки підозри порушень у глюкостероїдному виробництві: синдром Кушинга (гіперкортизолізм), хвороби Едісона або вторинної адреналінової недостатності (гіпокортизолізм).

В багатьох випадках необхідним є проведення активного тесту (пригнічення або стимуляція), щоб обмежити недолік одного з трьох основних рівнів (наприклад, адренального, пітуїтарного і гіпоталамічного).

#### 2. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір є твердофазним ферментнозв'язаним імуносорбційним набором, створеним по принципу **конкурентного зв'язування**. Мікротитрові лунки покриті моноклональним антитілом спрямованим до антигенів молекули кортизолу.

Ендогенний Кортизол зразка пацієнта конкурує з кон'югатом пероксидази кортизолу для зв'язування з покритим антигеном. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається.

Кількість кон'югату зв'язаної пероксидази обернено пропорційна концентрації кортизолу у зразку. Після додавання розчину субстрату, інтенсивність утвореного кольору обернено пропорційна концентрації кортизолу у зразку пацієнта.

#### 3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in vitro". Тільки для професійного використання.
2. Всі реагенти цього набору, які містять людську сироватку або плазму були протестовані і виявлені негативними на ВІЛ I/II, HbsAg та HCV схваленими процедурами FDA. Проте, всі реагенти слід вважати потенційно небезпечними під час використання та утилізації.
3. До початку аналізу повністю та уважно прочитайте інструкцію. Використовуйте дійсну версію інструкцій з використання, які постачаються з набором. Переконайтесь, що все вам зрозуміло.

4. Мікротитрові лунки містять відкривні смужки. Лунки, які не використовуються, потрібно зберігати при температурі від 2 до 8 °C у герметично закритій упаковці та використати до вказаного терміну.
5. Піпетування зразків та реагентів потрібно здійснювати якомога швидше і в однаковій послідовності для кожного етапу.
6. Використовуйте контейнери тільки для одних реагентів. Це особливо стосується резервуарів для субстрату. Використання резервуару для зберігання розчину субстрату, який перед тим використовувався для розчину кон'югату, може спричинити забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакони, тому що це може спричинити забруднення.
7. Ретельно перемішайте вміст мікротитрових лунк, щоб забезпечити добрі результати. Не використовуйте мікролунки повторно.
8. Не допускайте висихання лунк під час аналізу; додайте реагенти одразу після завершення етапів промивання.
9. Дозвольте реагентам досягнути кімнатної температури (21°C - 26°C) перед початком тесту. Температура впливає на показники абсорбції аналізу. Однак, на значення зразків пацієнта вона не впливає.
10. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків зі шкiрою і слизовими оболонками.
11. Не їжте, не пийте, не курить і не користуйтеся косметикою в приміщеннях обробки зразків або реагентів набору.
12. Одягайте одноразові рукавиці при роботі зі зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати фальшиві результати.
13. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
15. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток та мікротитрових планшетних зчитувачів.
16. Не змішуйте реагенти з наборів різних номерів лотів. Оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
17. Уникайте контакту зі *Стоп Розчином*, який містить 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Це може спричинити подразнення шкіри та опіки.
18. Деякі реагенти містять Proclin 300 BND і/або MIT в якості консервантів. У випадку попадання в очі або на шкіру, негайно промийте водою.
19. ТМБ субстрат має подразнюючий ефект на шкіру та слизові. У випадку можливого контакту, промийте очі великою кількістю води а шкіру - водою з милом. Помийте забруднені предмети перед повторним використанням. При вдиханні, виведіть людину на свіже повітря.
20. Хімікати і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
21. Інформація про небезпечні речовини, що входять до комплекту, див. у Паспорті безпеки цього виробу, який доступний за запитом безпосередньо у DRG.

#### 4. РЕАГЕНТИ

##### 4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитрові лунки**, 12 x 8 (роздільних) смужок, 96 лунок; Лунки покриті антитілом анти-Кортизол (моноклональне).
2. **Стандарт (Стандарт 0-6)**, 7 фл., 1 мл, готові до використання; Концентрації: 0, 20, 50, 100, 200, 400, 800 нг/мл, таким чином відповідає 0, 55.2, 138, 276, 552, 1104, 2208 нмоль/л. Фактор конверсії: 1 нг/мл = 2.76 нмоль/л. Не містить ртутний консервант.
3. **Ферментний кон'югат**, 1 фл. 25 мл, готовий до використання, Кортизол кон'югований до пероксидази хрому. Не містить ртутний консервант.
4. **Розчин Субстрату**, - 1 фл., 14 мл, готовий до використання, Тетраметилбензидин (ТМБ).
5. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, Містить 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Уникайте контакту з стоп розчином. Він може спричинити подразнення та опіки.
6. **Миючий розчин**, 1 фл., 30 мл (40x концентрований), Див. «Підготовка реагентів».

**Замітка:** Додатковий 0 стандарт для розведення зразків доступний за запитом.

##### 4.2 Необхідні матеріали, що не постачаються

- Мікротитровий планшетний калібрований зчитувач (450 нм±10 нм) (напр. The DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Калібровані змінні прицезійні мікропіпетки.
- Абсорбуючий папір.
- Дистильована або деіонізована вода
- Таймер

- Графічний папір або програмне забезпечення для зменшення даних

#### 4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8°C закриті реагенти залишаються реактивними до закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Всі відкриті реагенти необхідно зберігати при температурі 2-8°C. Мікротитрові лунки потрібно зберігати при температурі 2-8°C. Після відкриття упаковки, треба знову щільно її закрити. Відкриті набори залишаються активними протягом 5 тижнів, якщо зберігати так, як описано вище.

#### 4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням приведіть всі реагенти і необхідну кількість смужок до кімнатної температури.

#### Миючий розчин

Додайте деіонізовану воду до 40X концентрованого Миючого розчину. Розбавте 30 мл концентрованого Миючого Розчину 1170 мл деіонізованої води, щоб отримати об'єм 1200 мл. Розбавлений Миючий Розчин стабільний протягом 2 тижнів при кімнатній температурі.

#### 4.5 Утилізація набору

Утилізацію набору потрібно проводити відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Паспорті Безпеки.

#### 4.6 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника на протязі одного тижня після отримання продукту. Сильно пошкоджені компоненти не слід використовувати. Вони повинні зберігатися до остаточного рішення. Після цього їх слід утилізувати відповідно до офіційних правил.

### 5. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

Можна використовувати (EDTA-, Гепарин – або цитратну плазму).

Не використовуйте гемолітичні, чи ліпемічні зразки.

*Будь ласка, зверніть увагу:* Зразки, які містять азид натрію не потрібно використовувати у аналізі.

#### 5.1 Збір зразків

##### Сироватка:

Зробіть забір крові шляхом венепункції (напр. Sarstedt Monovette для сироватки), дозвольте їй згуститись, і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання. Для пацієнтів, які проходять антикоагулянтну терапію, потрібно більше часу для згортання крові.

##### Плазма:

Цільну кров необхідно зібрати в центрифужні пробірки, які містять антикоагулянти (напр. Sarstedt Monovette з відповідно підготовленою плазмою) і центрифугувати негайно після забору.

#### 5.2 Зберігання та підготовка зразків

Зразки повинні бути закриті і можуть зберігатись до 7 днів при температурі 2-8°C перед тестуванням. Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20° С. Після відтаювання зразки необхідно кілька разів легко потрясти перед тестуванням.

#### 5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі, зразок сироватки показує значення вище найвищого стандарту, зразок може бути розведений 0 Стандартом і проаналізований повторно як описано Процедурі аналізу.

Для обчислення концентрацій цей фактор розведення потрібно врахувати.

Наприклад:

- > Розведення 1:10: 10 мкл зразок + 90 мкл *Стандарт 0* (ретельно змішайте)
- > Розведення 1:100: 10 мкл а) розведення 1:10 + 90 мкл *стандарту 0* (ретельно змішайте).

### 6. ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ

#### 6.1 Загальні зауваження

- Перед початком тестування, приведіть всі реагенти до кімнатної температури. Всі реагенти змішуйте без утворення піни.
- Після початку тесту всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові наконечники для піпеток для кожного стандарту, контролю або зразка, щоб уникнути перехресного забруднення.

- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком тесту необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, всі необхідні лунки закріплені на тримачі і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однаковими інтервалами часу без перешкод.

- За правило, ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі.

#### 6.2 Процедура тесту

Кожний аналіз включає стандартну криву.

1. Відділіть необхідну кількість лунок;
2. Додайте **20 мкл** кожного **Стандарту, Контролю і зразків з новими одноразовими наконечниками** у відповідні лунки.
3. Додайте в кожен лунку **200 мкл Ферментного кон'югату**; Ретельно перемішуйте протягом 10 секунд. На цьому етапі є дуже важливим повне змішування.
4. Інкубуйте протягом **60 хвилин** при кімнатній температурі.
5. Різно вилийте вміст лунок; Промийте лунки **3 рази Миючим Розчином** (400 мкл на лунку); Промокніть лунки на промокальному папері, щоб видалити залишки;  
**Важливе зауваження:** Чутливість і точність цього аналізу залежить від правильності проведення процедури промивання!
6. Додайте **100 мкл Розчину Субстрату** в кожен лунку;
7. Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі;
8. Зупиніть ферментну реакцію додавши в кожен лунку **100 мкл Стоп-Розчину**;
9. Зчитайте дані абсорбції (ОЩ) кожної лунки на фотометрі при **450±10 нм**. Рекомендується зчитати лунки **протягом 10 хвилин** після додавання *Стоп Розчину*.

#### 6.3 Обчислення результатів

1. Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, використовуючи напівлогарифмічний графічний папір, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на осі (Y) та концентрацій на горизонтальній осі (X).
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичний метод: результати у інструкціях з використання були розраховані автоматично за допомогою кубічного спліну ( 4 Parameter Rodbard або 4 Parameter Marquardt є бажаними методами). Інші функції зменшення даних можуть дати дещо інші результати.
5. Концентрація зразків може зчитуватись зі стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище, ніж концентрація найвищого стандарту необхідно розбавити > 800 нг/мл. Для обчислення концентрацій цей фактор розбавлення необхідно враховувати.

#### 6.3.1 Типовий приклад стандартної кривої

Наступні дані тільки для демонстрації, тому не повинні використовуватись замість генерації даних під час аналізу.

Стандарт	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт 0 (0 нг/мл)	2.30
Стандарт 1 (20 нг/мл)	1.67
Стандарт 2 (50 нг/мл)	1.24
Стандарт 3 (100 нг/мл)	0.87
Стандарт 4 (200 нг/мл)	0.57
Стандарт 5 (400 нг/мл)	0.35
Стандарт 6 (800 нг/мл)	0.23

### 7. ОЧІКУВАНІ НОРМАЛЬНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

Результати кортизолу в сироватці або плазмі знаходяться в межах від 50 до 230 нг/мл (138-635 нмоль/л) між 8:00-10:00 год. ранку і від 30 до 150 нг/мл (82,8-414 нмоль/л) в 16:00 год.

Ці значення з підручника Тіца (2) і можуть використовуватись в якості основного орієнтира.

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

### 8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Гарна лабораторна практика вимагає, щоб контролю виконувалися з калібрувальною кривою. Статистично значна кількість контролів слід оцінювати для встановлення середніх значень і допустимих діапазонів для забезпечення належної продуктивності.

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних і федеральних правил. Використання контрольних зразків рекомендується для забезпечення щоденної достовірності результатів. Використовуйте контрольні на нормальному та патологічному рівнях.

Контролі та відповідні результати QC-лабораторії вказані в сертифікаті QC, доданому до набору. Значення і діапазони, вказані на паспорті QC, завжди посилаються на поточний лот наборів і повинні використовуватися для прямого порівняння результатів.

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

Використовуйте відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень і тенденцій. Якщо результати аналізу не відповідають встановленим допустимим діапазонам контрольних матеріалів, результати пацієнта повинні вважатися недійсними.

У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні області: пристрої піпетування та синхронізації; фотометр, термін придатності реагентів, умови зберігання та інкубації, способи аспірації та промивання.

Після перевірки вищезазначених пунктів, не виявивши жодної помилки, зверніться безпосередньо до дистриб'ютора або DRG.

## 9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу становить між 1.3 – 800 нг/мл.

### 9.2 Специфічність антитіл (Перехресна реактивність)

Наступні речовини були протестовані на перехресну реактивність:

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

Аналітичну чутливість DRG ELISA була обчислена шляхом віднімання 2 стандартних відхилень від середнього значення 20 повторів аналізів 0 Стандарту і становить 1.3 нг/мл.

### 9.4 Відтворюваність

#### 9.4.1 В межах аналізу

Змінність в межах аналізу показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	20	43.5	8.1
2	20	226.5	3.2
3	20	403.6	5.6

#### 9.4.2 Між аналізами

Змінюваність між аналізами показана нижче:

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
1	32	53.7	86.7
2	32	208.4	7.7
3	32	359.3	6.5

#### 9.4.3 Між лотами

Змінюваність між аналізами (між лотами) визначали шляхом вимірювання кожного зразка 6 разів з 3 наборів різних лотів (к-сть = 18):

Зразок	К-сть	Середнє (нг/мл)	КВ (%)
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 збагачені додаванням кортизолу при відомій концентрації 1:1. % відновлення обчислюється множенням коефіцієнту вимірювання 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 відновлення	Від	86.0	95.0
%	до	102.0	111.0
		91.0	95.0

### 9.5 Лінійність

Зразки вимірювали нерозведені та у серійних розведеннях 0 Стандартом. Відновлення (%) обчислювали шляхом множення очікуваних та 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 відновлення	Від	92.0	93.0
%	до	110.0	107.0
		89.0	94.0

### 10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні і відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу виконується з повним розумінням інструкції з вставки пакета і з дотриманням належної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження з зразками або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

#### 10.1 Інтерферуючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін (до 4 мг/мл), білірубін (до 0.5 мг/мл) і тригліцериди (до 7.5 мг/мл).

#### 10.2 Побічний ефект

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарств), що впливають на вимірювання кортизолу в зразку.

#### 10.3 Висока доза хук-ефекту

У цьому тесті відсутній хук-ефект.

## 11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

### 11.1 Достовірність результатів

Тест необхідно проводити точно згідно з інструкціями виробника. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил GLP (Good Laboratory Practice) або інших застосованих національних стандартів та/або законів. Це особливо стосується використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в тестовій процедурі достатню кількість контролів для перевірки точності та достовірності тесту.

Результати випробувань є дійсними лише тоді, коли всі контролі знаходяться в межах вказаних діапазонів і якщо всі інші параметри випробувань також входять до заданих специфікацій аналізу. У разі виникнення будь-яких сумнівів або занепокоєння звертайтеся до DRG.

### 11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватися на результатах одного тесту, а повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта. Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

### 11.3 Надійність

Будь-які зміни тестового набору і/або зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах тесту. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



#### **ВИРОБНИК**

ДРГ Інструментс ГмбХ  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/17 00 50  
[www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drq@drq-diagnostics.de)



#### **УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК**

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

