

НАБОР КОРТИЗОЛ [¹²⁵I]**RIA**

(Номер по каталогу: RK-240CT)

Описание

Система Кортизол [¹²⁵I] позволяет проводить количественное определение кортизола *in vitro* в сыворотке человека. Кортизол может определяться в диапазоне 0-1600 нмоль/л (0-580 нг/мл). Материалов в каждом наборе достаточно для проведения исследований в 100 пробирках, позволяя выстраивать одну калибровочную кривую и проводить парные анализы 42 неизвестных и 1 контрольного образцов.

Введение

Кортизол является основным глюкокортикоидным гормоном, который синтезируется в корковом веществе надпочечников. Он регулирует метаболизм углеводов, белков, жиров, пуринов, электролитный и водный баланс. Кортизол участвует в регуляции артериального давления и обладает противовоспалительным действием. Определение уровней кортизола может использоваться с целью диагностики функциональных нарушений гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (НРА).

У здоровых людей для секреции кортизола характерен определенный ритм: самый высокий уровень кортизола наблюдается утром, к вечеру уровень снижается примерно наполовину.

Принцип метода

Данный анализ основан на конкуренции между немеченным кортизолом и фиксированным количеством кортизола меченного ¹²⁵I за ограниченное количество связывающих участков антител, специфических для кортизола. Позволяя вступать в реакцию фиксированному количеству меток и антител с различным количеством немеченных лигандов, количество меток связанных с антителом будет обратно пропорционально концентрации немеченных лигандов.

В течение 2-часового инкубационного периода при постоянном перемешивании иммунный комплекс иммобилизуется на поверхности пробирок с нанесенным реактивом. После инкубации реакционную смесь извлекается и с помощью гамма-счетчика определяется ее радиоактивность.

Концентрация антигена прямо пропорциональна уровню радиоактивности в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество кортизола, может быть определена искомая концентрация кортизола в образцах пациента.

Содержание набора

1 флакон	¹²⁵ I-МЕТКА, готовая к использованию. 55 мл на флакон, содержащий < 260 кБк ¹²⁵ I-кортизола в буфере с 0,1% NaN ₃ .
6 флаконов	СТАНДАРТЫ, готовые к использованию 0,5 мл на флакон, содержащий 0, 40, 100, 250, 650, 1600 нмоль/л кортизола в сыворотке с 0,1% NaN ₃ .
1 флакон	АНТИСЫВОРОТКА, готовая к использованию. 55 мл на флакон, содержащий поликлональные анти-кортизол (кроличьи) IgG в буфере с 0,1% NaN ₃ .
1 флакон	КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА Лиофилизированная сыворотка крови человека с 0,1% NaN ₃ . Концентрация сыворотки указана в сертификате качества.
2 коробки	ПРОБИРКИ С ПОКРЫТИЕМ, готовые к использованию 2x50 пробирок, 12x75 мм, упакованные в пластиковые коробки.
1	Сертификат качества
1	Листок-вкладыш.

Необходимые материалы и оборудование

Штатив для пробирок, градуированные пипетки с одноразовыми наконечниками (объем 10 и 500 мкл), вихревая мешалка, шейкер, полимерная пленка, адсорбирующий материал, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование:
многообразные пипетки

Приготовление реактивов

Добавьте к лиофилизированной контрольной сыворотке 500 мкл дистиллированной воды. Аккуратно перемешайте встряхиванием или вихревыми движениями (следует избегать пенообразования). Убедитесь, что содержимое полностью растворилось, и дайте раствору уравновеситься при комнатной температуре в течение, по крайней мере, 20 минут.

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть приготовлены согласно общепринятым методикам, которые рутинно используются в клинической лабораторной практике. Сыворотка может храниться при температуре 2-8°C в течение двух дней с момента взятия. Для проведения анализа в более поздний

период следует подвергнуть образцы глубокой заморозке.

Процедура количественного определения

(Для быстрого поиска см. Таблицу 1.)

1. Перед использованием уравновесьте все реактивы и образцы до комнатной температуры.
2. Промаркируйте пробирки с покрытием в двух экземплярах для каждого стандарта (S1-S6), контрольной сыворотки (C) и образца (Sx). По выбору, промаркируйте две пробирки без покрытия для полного счета (T).
3. Гомогенизируйте все реактивы и образцы путем плавного перемешивания для предотвращения пенообразования.
4. Отмерьте пипеткой в пробирки промаркированные должным образом по 10 мкл раствора стандарта, контрольной сыворотки и образца.
5. Отмерьте пипеткой в каждую из пробирок 500 мкл метки.
6. Отмерьте пипеткой в каждую из пробирок 500 мкл антисыворотки, за исключением T.
7. Прочно зафиксируйте штатив с пробирками на шейкере. Герметизируйте все пробирки с помощью полимерной пленки. Включите шейкер и настройте скорость, требуемую для того, чтобы жидкость в каждой пробирке постоянно вращалась и перемешивалась.
8. Выдерживайте пробирки в течение 2 часов при комнатной температуре.
9. Слейте супернатант из всех пробирок путем переворачивания штатива. Поместите штатив на фильтровальную бумагу перевернув верхнюю часть вниз на 2 минуты.
10. Определите уровень радиоактивности каждой пробирки в гамма-счетчике в течение, по крайней мере, 60 секунд.
11. Рассчитайте концентрации кортизола в образцах, в соответствии с описанием, приведенным в разделе расчет результатов.

Таблица 1. Протокол количественного определения, руководство по работе с пипетками (все объемы указаны в микролитрах)

Пробирки	Общее количество (T)	Стандарт (S1-S6)	Образец (Sx)	Контроль (C)
Стандарт		10		
Образец			10	
Контроль				10
Метка	500	500	500	500
Антисыворотка		500	500	500
Перемешивать в течение 2 часов при комнатной температуре.				
Слить жидкость и поместить осадок на фильтровальную бумагу на 5 минут.				
Рассчитать показатели во всех пробирках				

Расчет результатов

Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2.

Определите среднее значение в минуту (СРМ) для каждой пары анализируемых пробирок.

Рассчитайте процент В0/Т для нулевого стандарта (S1) используя следующую формулу:

$$\text{В0/Т \%} = 100 * \text{S}_1(\text{cpm}) / \text{Т}(\text{cpm})$$

Рассчитайте приведенный процент связывания для каждого раствора стандарта, контроля и образца соответственно, используя следующую формулу:

$$\text{В/В}_0 \text{ \%} = 100 * \text{S}_{2-6} ; \text{C} ; \text{S}_x(\text{cpm}) / \text{S}_1(\text{cpm})$$

Для упрощения расчета значения для неспецифического связывания (NSB) не исправлены. Поскольку NSB составляет менее 3% от общего количества.

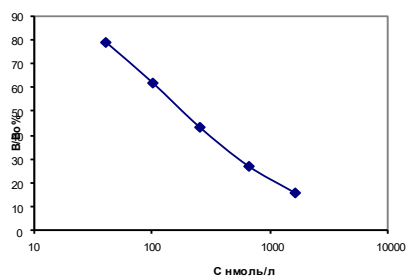
Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу постройте график В/В0 (%) для каждого стандарта напротив соответствующей концентрации кортизола. На Рисунке 1 показана типичная калибровочная кривая.

Определите концентрацию кортизола в неизвестных образцах методом интерполяции из калибровочной кривой. Не рекомендуется экстраполировать показатели, лежащие за пределами диапазона калибровочной кривой. Так же доступны автоматизированные системы обработки данных.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Количество СРМ1	Количество СРМ2	Среднее значение СРМ	В/Т %	В/В0 %
Т	90172	89562	89867		
S1	51816	51699	51758	57.6	100
S2	41325	40790	41058	45.7	79.3
S3	32114	32332	32223	35.9	62.3
S4	23112	22076	22594	25.1	43.7
S5	14264	13917	14091	15.7	27.2
S6	8272	8347	8309,5	9,2	16,1
С	19600	18893	19247	21,4	37,2

Рисунок 1: Типичная калибровочная кривая (Не используйте для расчета значений образцов)



Преобразование единиц СИ можно выполнить в соответствии со следующей формулой:

$$1 \text{ нмоль/л} = 0,362 \text{ нг/мл}$$

Характеристика количественного определения

Параметры количественного определения

Параметры	Значение
В0/Т	56 ± 10 %
ED-50	180 ± 36 нмоль/л

Специфичность

Ниже показана перекрестная реактивность с различными веществами антисыворотки кортизола использующейся в наборе:

Добавленная концентрация стероидов	Кажущаяся концентрация кортизола нМ	
	70 нМ	700 нМ
Кортикостерон	6	30
17-α-гидрокси-прогестерон	<ПО	13
Кортизон	<ПО	6
11-деоксикортизол	10	56
Деокси-кортикостерон	<ПО	12
Преднизолон	64	428
Дексаметазон	<ПО	15

ПО – предел обнаружения

Показанные ниже стероиды в концентрациях ниже 700 нМ не выявляются при определении кортизола: 17β-эстрадиол, прогестерон, 5-α-дигидротестостерон, 5-β-дигидро-19-нор-тестостерон, тестостерон, андростендион, андростендиол, 17-α-метил-тестостерон, андростандиол, альдостерон, прегненолон, 19-нор-тестостерон, дигидроэпиандростерон, эстриол, эстрон.

Чувствительность

2.9 нмоль/л определена, как концентрация 2 стандартных отклонений от нулевого стандарта.

Точность, воспроизводимость

Между количественными определениями (7 анализов в 2 повторях)		В ходе количественного определения (1 анализ в 10 повторях)	
Среднее	CV%	Среднее	CV%
45.7	1.65	46.5	6.25
86.0	3.15	84.6	3.70
223.9	3.33	237.7	6.81
339.6	1.77	398.3	3.16
427.1	2.87	439.6	2.47
792.6	4.56	766.5	4.51
1113.9	4.70	1142.8	5.62

Восстановление

Восстановление было определено, как измеренное увеличение показателя, выраженное в процентах относительно ожидаемого увеличения пиковых

значений в образцах сыворотки с известным уровнем кортизола. Показатель восстановления при анализе 16 образцов сыворотки с пиковыми значениями кортизола составил 92 ± 7 %.

Ожидаемые эталонные значения

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определяла собственный диапазон эталонных значений. Представленные здесь ожидаемые значения основаны на исследованиях здоровых доноров крови (90 мужчин и 90 женщин). **Образцы были взяты в период с 8 до 11 ч утра.**

На основании статистического анализа были выявлены следующие результаты: среднее ± СО = 353 ± 139 нмоль/л абсолютный диапазон = 127-859 нмоль/л. Результаты исследований кортизола в сыворотке были нормально распределены после логарифмического преобразования, и был рассчитан доверительный интервал 95%. **Диапазон нормальных значений кортизола основанный на интервале 95% составляет 147-726 нмоль/л.**

Дополнительная информация

Ограничения

Реагенты поставляемые с данным набором предназначены для определения уровня кортизола в сыворотке и плазме. Следует предотвращать возможность нарушения герметичности упаковки и размораживания реагентов и образцов. Не следует использовать гемолизированные и липемические образцы, так как они могут дать ложные значения.

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Данный набор следует применять только с диагностической целью в условиях in vitro.

Хранение

Хранить реагенты при температуре 2-8°C. Все реагенты стабильны при данной температуре до даты истечения срока годности набора.

Доступность

Со склада.

Срок хранения

Фактическая дата истечения срока годности указана на этикетке упаковки и в сертификате качества.

Меры предосторожности и предостережения

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Получение, приобретение, владение или использование радиоактивных материалов является предметом, на который распространяются нормативные документы и лицензии (меж) национальных уполномоченных органов.

Пользователь несет ответственность за соблюдение местных нормативных документов или правил работы с радиоактивными материалами.







Потенциально инфицированные материалы

Продукты человеческой крови, которые используются в наборе, были получены от здоровых доноров. Они были подвергнуты индивидуальным исследованиям с использованием утвержденных методов (иммуноферментный анализ), по результатам которых были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1) и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg).

При работе с образцами, полученными от человека, которые подлежат исследованию с использованием диагностических наборов, необходимо всегда соблюдать осторожность. Даже если пациент прошел необходимые обследования, ни один из методов не может дать полной гарантии отсутствия возбудителей вируса гепатита В, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) или других инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека необходимо обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Химическая и другая опасность

Некоторые компоненты данного набора содержат азид натрия (0.1 % масса/объем) в качестве антимикробного агента. При утилизации отходов их необходимо смывать большим количеством воды для предотвращения накопления взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Общее содержание азидов в каждой упаковке составляет 114 мг.

	Использовано		Номер партии
	Температурный предел Хранить при температуре 2-8°C		Контроль
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Стандарт
	Биологическая опасность		Пробирка с покрытием
	Обратитесь к инструкции по использованию		Метка
	Устройство для проведения диагностики <i>in vitro</i>		Антисыворотка
	Производитель		Номер по каталогу
	Радиоактивный материал		

Вебсайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail:

commerce@izotop.hu



ООО «Институт изотопов»

1535 Будапешт. Pf.: 851.

Тел.: (36-1) 392-2577,

Факс: (36-1) 395-9247

Обновлено: 04.12.2013