



ELISA

Mikrotitrační metoda

Kortizol

Ref. č. K00201

Pro in vitro diagnostické použití

Produktový leták

ELISA pro **kvantitativní** stanovení kortizolu v lidském séru nebo plazmě



Mikrotitrační metoda – 96 jamková

(12 x 8 jamkových antigenem potažených proužků)

Jednotlivě zlomitelné

| |
|------------------|
| OBEČNÉ INFORMACE |
|------------------|

○ **Vlnová délka**

Měřicí filtr: 450 nm

Referenční filtr: 620 -630 nm

○ **Doba inkubace**

75 minut (60 min při 37°C/15 min při pokojové teplotě)

○ **Enzymový konjugát**

HRP (křenová peroxidáza)

○ **Substrát**

TMB (3,3',5,5'- Tetrametyl-benzidin)

○ **Vzorek**

Sérum nebo plazma

○ **Kalibrační rozsah**

0 – 500 ng/mL

○ **Citlivost**

2,42 ng/mL

○ **Trvanlivost a stabilita součástí kitu**

Kit: 15měsíců od data výroby

Součástí kitu: Viz datum expirace na označení

1. REAGENCIE, MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

1.1 Reagencie a materiál dodávaný v kitu

Kalibrátor (C_A-C_B-C_C-C_D-C_E): 5x1.0 mL/vialka

Kalibrátory kortizolu mají následující koncentrace:

| | C _A | C _B | C _C | C _D | C _E |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ng/mL | 0,0 | 10 | 50 | 150 | 500 |

Jsou stabilní do data expirace kitu. Po otevření voalky je kalibrátor stabilní po dobu 6 měsíců při 4 °C. Před použitím 5 minut jemně míchejte pomocí rotačního mixéru.

Kontrola kortizolu: 1x 1 L, viz koncentrace kontry na certifikátu analýzy.

Konjugát: 1x 21 mL/vialku konjugátu kortizol -HRP

Potažená mikrotitrační destička: 12 x 8 proužků jamek s nabsorbovanou IgG protilátkou proti kortizolu

Roztok substrátu: 1x 15 mL/vialku H₂O₂-TMB 0.26g/L (zabaňte jakémukoli styku s pokožkou)

Zastavovací roztok: 1x 15 mL/vialku kyseliny sírové 0.15 mol/L (zabaňte jakémukoli styku s pokožkou)

Promývací pufr: 1x 50 mL, 10x koncentrát, fosfátový pufr 0.2 M, pH 7.4

1.2 Potřebné reagencie, které nejsou dodávány s kitem

- Destilovaná voda

1.3 Potřebný materiál a přístrojové vybavení

- Automatický dávkovač
- Reader mikrotitračních destiček (450 nm, 620-630 nm)

1.4 Poznámky

Skladujte při 2 – 8 °C ve tmě. Sáček s mikrotitrační destičkou otevírejte, pouze když je ohřátá na pokojovou teplotu a okamžitě po použití uzavřete. Neodstraňujte přilnavou fólii z nepoužitých proužků. Po otevření je kit stabilní do data expirace.

2. KLINICKÝ VÝZNAM

Kortizol je steroidní hormon uvolňovaný z kůry nadledvin jako odpověď na hormon nazývaný ACTH (tvořený hypofýzou). Je zapojen v stresové odpovědi; zvyšuje krevní tlak, krevní hladiny cukru, může způsobovat neplodnost žen a utlumuje imunitní systém.

Kortizol působí přes specifické vnitro buňkové receptoty a má vliv na mnoho fyziologických systémů včetně imunitních funkcí, regulace vyvažování glukózy, svalový tonus, získávání substrátů a metabolismus kostí. Kortizol je vylučován primárně močí v nevázané (volné) formě. Kortizol je v plazmě navázán na kortikosteroid vázající globulin (CBG, transkotin) s vysokou afinitou a na albumin. Pro většinu receptorů je dostupný pouze volný kortizol. Množství kortizolu přítomného v séru podléhá diurnálním změnám s nejvyššími hladinami přítomnými skoro ráno a nejnižšími hladinami večer, několik hodin od začátku spánku. Nejvyšší hladiny jsou mezi 6 – 8 hodinou ráno a nejnižší kolem půlnoci. Tyto běžné endogenní funkce jsou základem fyziologických důsledků chronického stresu – prodloužené sekrece kortizolu zapříčiňujících svalovou únavu, hyperglykemii, a potlačování imunitních/zápalových odpovědí. Stejně důsledky vznikají z prodlouženého užívání glukokortikoidních léků.

3. PRINCIP

Kortizol (antigen) ve vzorku soutěží s kortizolem značeným křenovou peroxidázou (enzymem značený antigen) o omezené množství vazebných míst proti kortizolu (protilátky) na destičkách (pevná fáze). Po inkubaci se vykonává separace navázaných a volných molekul jednoduchým promytím pevné fáze. Potom enzym HRP v navázané frakci reaguje se substrátem (H_2O_2) a TMB substrátem a vytváří modrou barvu, která se mění na žlutou po přidání zastavovacího roztoku (H_2SO_4).

Intenzita barvy je nepřímě úměrná koncentraci kortizolu ve vzorku. Koncentrace kortizolu ve vzorku je vypočtena pomocí kalibrační křivky.

4. VAROVÁNÍ

- Kit je určen pro profesionální in vitro použití. Ne pro vnitřní nebo vnější užití u lidí nebo zvířat.
- Při práci s dodanými reagensy používejte vhodné osobní ochranné vybavení.
- Během manipulace s krevními produkty dodržujte správnou laboratorní praxi (GLP).
- Materiály zvířecího původu použité v přípravě kitu byly získány ze zvířat certifikovaných jako zdravých a hovězí protein byl získán z krajín nezasažených BSE, ale nicméně je třeba s těmito materiály zacházet jako s potencionálně infekčními.
- Některé reagensy obsahují malé množství ProClin 300 jako konzervantu. Zabraňte styku s pokožkou a sliznicemi.
- Substrát TMB obsahuje dráždivou látku, která může být nebezpečná po vdechnutí, požití nebo po absorpci pokožkou. Pro předcházení poranění zabraňte vdechnutí, požití nebo styku s pokožkou a očima.
- Zastavovací roztok pozůstává z roztoku zředěné kyseliny sírové. Kyselina sírová je jedovatá a korozivní a může být toxická po požití. Pro předcházení chemickým poleptáním zabraňte styku s pokožkou a očima.
- Vyhněte se vystavení substrátu TMB/ H_2O_2 přímému světlu, kovům a oxidantům. Roztok nezamrazujte.
- Tato metoda umožňuje stanovení kortizolu od 10 ng/mL do 500 ng/mL.
- Klinický význam stanovení kortizolu může být zneplatněn, pokud byl pacient léčen kortikosteroidy nebo přírodními nebo syntetickými steroidy.

5. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Dodržujte prosím přesně postupnost pipetovacích kroků uvedených v protokolu. Zde uvedené údaje činnosti byly získány s použitím specifických reagensů uvedených v těchto pokynech k použití.
- Všechny reagensy musí být skladovány v chladu při teplotě 2 - 8 °C v jejich původních nádobách. Jakékoli výjimky jsou jasně uvedeny. Reagensy jsou stabilní do data expirace, pokud jsou skladovány a je s nimi manipulováno podle pokynů.
- Před testováním nechte všechny součásti kitu a vzorky dosáhnout pokojovou teplotu (22-28 °C) a dobře je promíchejte.
- Nezaměňujte součásti kitu z různých šarží. Datum expirace vytisknutý na označení krabice a vialky je nutné dodržovat. Nepoužívejte žádné součásti kitu po datu expirace.
- Pokud používáte automatizované vybavení je vaší zodpovědností ujistit se, že kit byl vhodně otestován.
- Neúplné nebo nepřesné odstranění kapaliny z jamek může ovlivnit přesnost analýzy a/nebo zvýšit pozadí. Pro zlepšení činnosti kitu na automatických systémech je doporučeno zvýšení počtu promytí.
- Je důležité, aby byla ve všech jamkách udržena konstantní doba reakce, kvůli opakovatelnosti výsledků. Pipetování vzorků by nemělo trvat déle než 10 minut, aby se zamezilo driftu analýzy. Pokud je potřebných víc jako 10 minut, dodržujte stejné pořadí dávkování. Pokud se používá více než jedna destička, doporučuje se zopakovat kalibrační křivku odezvy v každé destičce.

- Přidání TMB substrátu spouští kinetickou reakci, která je ukončena přidáním zastavovacího roztoku. Proto musí být TMB substrát a zastavovací roztok přidávány v stejné sekvenci, aby se zamezilo jakýmkoli časovým změnám v průběhu reakce.
- Dodržujte směrnice pro vykonávání kontroly kvality v zdravotnických laboratořích měřením kontrol nebo spoolovaných (spojených) sér.
- V analýze by se neměly používat mikrobiologicky kontaminované vzorky. Stejně by se neměly používat vysoce lipemické nebo hemolyzované vzorky.
- Readery destiček měří vertikálně. Nedotýkejte se spodní strany destičky.

6. POSTUP TESTU

6.1 Příprava kalibrátorů

Kalibrátory jsou připraveny k použití a mají následující koncentrace kortizolu:

| | C _A | C _B | C _C | C _D | C _E |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ng/mL | 0,0 | 10 | 50 | 150 | 500 |

Stabilita: do data expirace uvedeného na kitu

6.2 Příprava konjugátu

Konjugát je připraven k použití 5 minut jemně míchejte rotačním shakerem.

Po otevření je stabilní po dobu 6 měsíců při teplotě 2-8 °C.

6.3 Příprava vzorku

Stanovení kortizolu je možné vykonat jak v plazmě, tak i v séru. Pokud stanovení neprobíhá v stejný den, skladujte vzorky při - 20 °C. vyhněte se opakovanému zamrazování a rozmrazování vzorků.

Kontrola je připravena k použití.

6.4 Příprava promývacího roztoku

Obsah každé vialky „promývacího roztoku (10x koncentrát)“ zředte před použitím destilovanou vodou na celkový objem 500 mL. Pro menší objemy dodržujte poměr 1:1. Zředěný promývací roztok je stabilní 30 dní při 2-8 °C.

V koncentrovaném promývacím roztoku je možné pozorovat přítomnost krystalů; v tomto případě jej míchejte při pokojové teplotě až do úplného rozpuštění krystalů; pro větší přesnost zředte celou láhev koncentrovaného promývacího roztoku na 500 mL, dbejte na to, abyste krystaly kompletně přesunuli a potom míchejte do jejich úplného rozpuštění.

6.5 Postup

- **Všechny reagentie nechte dosáhnout pokojové teploty (22 – 28 °C) po dobu alespoň 30 minut.** Po skončení analýzy uskladněte všechny reagentie okamžitě při teplotě 2-8 °C: vyhněte se dlouhému vystavení pokojové teplotě.
- Nepoužité potažené mikrotitrační proužky je třeba bezpečně uzavřít ve vřecku s desikantem a uskladnit při 2-8 °C.
- Pro zabránění potencionální mikrobiální nebo chemické kontaminace se nepoužité reagentie nesmí přenášet zpátky do původních nádob.
- Protože je nezbytné vykonávat stanovení v duplikátech, připravte si dvě jamky pro každý z pěti bodů kalibrační křivky (C_A - C_E), dvě pro každý vzore, dvě pro kontrolu a dvě pro blank.

Pipetujte:

| | Kalibrátor | Vzorek/Kontrola | Blank |
|------------------------|-------------|-----------------|-------|
| Vzorek/Kontrola | --- | 20 μ L | --- |
| Kalibrátor $C_A - C_E$ | 20 μ L | --- | --- |
| Enzymový konjugát | 200 μ L | 200 μ L | --- |

Destičku zakryjte a inkubujte při 37 °C po dobu 1 hodiny.

Odstraňte obsah každé jamky; jamky promyjte třikrát 300 μ L zředěného promývacího roztoku.

Důležitá poznámka: během každého promývacího kroku destičkou 5 sekund jemně zatřeste a odstraňte nadbytečný roztok oklepáním obrácené destičky o absorpční papírový ubrousek.

Automatická promývačka: v případě že používáte automatickou promývačku, doporučuje se vykonávat 6 promývacích kroků.

Pipetujte:

| | Kalibrátor | Vzorek/Kontrola | Blank |
|------------------|-------------|-----------------|-------------|
| Roztok substrátu | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |

Inkubujte při pokojové teplotě (20 – 28 °C) po dobu 15 minut ve tmě.

Pipetujte:

| | Kalibrátor | Vzorek/Kontrola | Blank |
|--------------------|-------------|-----------------|-------------|
| Zastavovací roztok | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |

Destičkou jemně třeste.

Změřte absorbanci (E) při 450 nm oproti referenční vlnové délce 620 – 630 nm nebo oproti blanku v průběhu 5 minut.

7. KONTROLA KVALITY

Každá laboratoř musí měřit kontroly při normální, vysoké a nízké hladině rozsahu kortizolu pro sledování činnosti metody. S těmito kontroly je třeba zacházet jako s neznámými a v každém provedeném testovacím běhu pro ně stanovit hodnoty. Je potřebné udržovat tabulky kontroly kvality kvůli sledování činnosti dodávaných reagensů. Pro zjištění trendů je potřebné použít vhodné statistické metody. Jednotlivá laboratoř si musí určit přijatelné limity činnosti metody. Další parametry, které je potřebné sledovat, jsou 80, 50 a 20 % průsečíky kalibrační křivky pro opakovatelnost od běhu k běhu. Dále musí být maximální absorbance konsistentní s dřívějšími měřeními. Značná odchylka od určené činnosti může značit nepostřehnutou změnu v experimentálních podmínkách nebo degradaci reagensů kitu. Pro určení důvodu změn je potřebné použít čerstvé reagensie.

8. VÝSLEDKY

8.1 Průměrná absorbance

Vypočtete průměrnou absorbanci (E_m) každého bodu kalibrační křivky ($C_A - C_E$) a pro každý vzorek.

8.2 Kalibrační křivka

Vyneste průměrnou hodnotu absorbance (E_m) kalibrátorů ($C_A - C_E$) oproti jejich koncentraci. Přeložte nejlépe se překrývající křivku přes vnesené body. (např.: 4 parametrická logistická)

8.3 Výpočet výsledků

Interpolujte hodnoty vzorků z kalibrační křivky, abyste získali příslušné hodnoty koncentrace uvedené v ng/mL.

9. REFERENČNÍ ROZSAH

Referenční hodnoty kortizolu v séru nebo plazmě jsou:

60 – 230 ng/mL mezi 8.00 – 10.00 hodinou ranní

30 – 150 ng/mL o 4.00 poobědě

Pacienti léčení ACTH: 280 – 600 ng/mL

Pacienti léčení dexamethazonem: 0 – 50 ng/mL

10. CHARAKTERISTIKY ČINNOSTI**10.1 Preciznost****10.1.1 Rozptyl v rámci analýzy**

Rozptyl v rámci analýzy byl určen opakovaným měřením (16x) dvou různých kontrolních sér v jedné analýze. Rozptyl v rámci analýzy je $\leq 5.1\%$.

10.1.2 Rozptyl mezi analýzami

Rozptyl mezi analýzami byl určen opakovaným (10x) měřením třech různých kontrolních sér v různých šaržích. Rozptyl mezi analýzami je $\leq 11,0\%$.

10.2 Specificita

Křížové reakce protilátky vypočteny při 50 % podle Abrahama jsou uvedeny v tabulce:

| | | |
|-----------------------------|-------|---|
| Kortizol | 100 | % |
| Prednisolon | 46.2 | % |
| 11-deoxykortizol | 4 | % |
| Kortizon | 3.69 | % |
| Prednison | 3.1 | % |
| Kortikosteron | 1.34 | % |
| 11 α -OH Progesteron | 1 | % |
| Progesteron | <0.01 | % |
| Aldosteron | <0.01 | % |
| Pregnenolon | <0.01 | % |
| 17 β Estradiol | <0.01 | % |
| Estron-3-sulfát | <0.01 | % |
| Estriol | <0.01 | % |
| Testosteron | <0.01 | % |
| Spironolakton | <0.01 | % |
| DHEA | <0.01 | % |
| DHEA-S | <0.01 | % |
| Androstenedion | <0.01 | % |
| Androstenron | <0.01 | % |
| DHT | <0.01 | % |
| Danazol | <0.01 | % |
| Cholesterol | <0.01 | % |
| Dexametazon | <0.01 | % |

10.3 Specificita

Interference bilirubinu, hemoglobinu a triglyceridů byla prozkoumána v tomto kitu DIALAB Kortizol:

Kortizol

| Látka | Naměřená koncentrace | Interference |
|--------------|----------------------|--------------|
| Bilirubin | 0.2 mg/mL | Žádná |
| Hemoglobin | 2 mg/mL | Žádná |
| Triglyceridy | 6 mg/mL | Žádná |

Pro zkoumané látky nebyla pozorována žádná interference. Podle správné laboratorní praxe se vyhýbejte vysoce lipemickým a hemolytickým vzorkům séra.

Byla vyhodnocena interference ve vzorcích plazmy a SST (zkumavka na separaci plazmy). Sérum získané od stejného pacienta bylo použito jako referenční materiál.

| Vzorek | Interference |
|-----------------------------------|--------------|
| SST (zkumavka na separaci plazmy) | Žádná |
| EDTA plazma | Žádná |
| Plazma s heparinem lithným | Žádná |
| Plazma s heparinem sodným | Žádná |

Nebyla pozorována žádná interference

10.4 Přesnost

Výtěžnost 15 - 35 - 70 ng/mL kortizolu přidaného ke vzorkům poskytla průměrnou hodnotu (\pm SD) 101.61 % \pm 4.42 % vzhledem k původní koncentraci. Test ředění vykonaný na třech sérech ředěných 2 - 4 - 8 krát poskytl průměrnou hodnotu (\pm SD) 106.18 % \pm 4.68 %.

10.5 Citlivost

Nejnižší stanovitelná koncentrace kortizolu, kterou je možné odlišit od nulového kalibrátoru je 2.42 ng/mL při 95 % konfidenční hranici.

10.6 Korelace

DIALAB kortizol ELISA byla porovnána s komerčně dostupnou chemiluminiscenční analýzou kortizolu. Bylo změřeno 61 vzorků séra.

Byla vypočtena křivka lineární regrese

$$y = 1.09x - 19.23$$

$$r = 0.904$$

11. NAKLÁDÁNÍ S ODPADEM

Reagencie musí být likvidovány podle místních nařízení.

12. LITERATURA

- Foster, L.B. and Dunn, R.T., Clin. Chem: 20/3, 365 (1974)
- De Lacerda, L., Kowarowski, A., and Migeon, C.J., J. Clin. Endocr. And Metab: 36, 227 (1973)
- Roller, E., Zannino, M., Orlandini, S., Malvano, R., Clin Chim Acta: 66, 319 (1976)
- Kabayashi, Y., et al., Steroids, 32 no. 1 (1978)
- Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A., Anal Biochem. 97: 248 (1979)



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten und
Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NO Süd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 60910-0, Fax: ++43 (0) 2236 60910-30, e-mail: office@dialab.at