

CORTISOL [I-125] RIA KIT

(REF: RK-240CT)

Beschreibung

Der ¹²⁵I Cortisol Assay dient der quantitativen *in vitro* Bestimmung von Cortisol in humanem Serum. Das Cortisol hat einen Messbereich von 0-1600 nmol/L (0 – 580 ng/mL). Jede Kit-Packung enthält ausreichende Reagenzien für insgesamt 100 Bestimmungen, was die Anfertigung einer Standardkurve sowie die Bestimmung von 42 Unbekannten und einer Kontrolle in Duplikaten erlaubt.

Einleitung

Cortisol ist das Hauptglukokortikoid welches in der Nebennierenrinde produziert wird. Es reguliert den Kohlenhydrat-, Protein-, Fett und Purin Stoffwechsels sowie das Elektrolyt- und Wassergleichgewicht. Cortisol spielt außerdem bei der Regulation des Blutdrucks und der Auflösung von Entzündungen eine Rolle.

Die Bestimmung des Cortisol Spiegels kann für die Diagnose von funktionalen Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-(HPA)-Achse herangezogen werden.

In gesunden Individuen folgt die Cortisol Sekretion einem charakteristischen Rhythmus: Morgens ist der Cortisol Spiegel am höchsten während er am Abend ungefähr auf die Hälfte absinkt.

Testprinzip

Dieser Assay basiert auf der Competition von unmarkiertem Cortisol und einer fixierten Menge an I¹²⁵-markiertem Cortisol um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen eines Cortisol spezifischen Antikörpers. Da eine fixe Anzahl an Tracern und Antibody mit verschiedenen Mengen an unmarkiertem Liganden reagieren können, ist die Anzahl der Tracer die an den Antikörper gebunden haben invers proportional zu der Konzentration von unmarkiertem Liganden.

Die Immunkomplexe werden während einer zwei stündigen Inkubationszeit auf dem Schüttler an die reaktive Oberfläche der beschichteten Teströhrchen gebunden. Das Reaktionsgemisch wird anschließend verworfen und die Radioaktivität in einem Gamma-Counter Messgerät gemessen.

Die Antigenkonzentration ist invers proportional zu der gemessenen Radioaktivität in den Teströhrchen. Anhand der mitgelieferten Kalibratoren und deren definierten Konzentrationen wird eine Eichkurve erstellt und aus dieser die Cortisol Konzentrationen der unbekannt Patientenproben ermittelt.

Mitgelieferte Reagenzien

- 1 Flasche TRACER, gebrauchsfertig. 55 mL pro Flasche, enthält < 260 kBq ¹²⁵I-Cortisol in Puffer mit 0,1% NaN₃
- 6 Flaschen Kalibratoren, Gebrauchsfertig. 0,5 mL pro Flasche. Enthalten 0; 40; 100; 250; 650; 1600 nmol/L Cortisol in Serum mit 0,1 % NaN₃.

- 1 Flasche ANTISERUM, gebrauchsfertig. 55 mL pro Flasche. Enthält polyklonales anti-Cortisol (Kaninchen) IgG in Puffer mit 0,1 % NaN₃.
- 1 Flasche KONTROLLSERUM. Lyophilisiertes human Serum mit 0,1% NaN₃.
- 2 Boxen Beschichtete Teströhrchen, 2x50 Stück, 12x75 mm verpackt in Plastikboxen. QC-Datenblatt. Packungsbeilage.

Zusätzlich benötigtes Material

Ständer für Teströhrchen, Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen (10 und 500 µL), Vortex Mixer, Schüttler, Plastikfolie, Saugfähiges Papier. Gamma-Counter.

Empfohlenes Material

Multipette.

Vorbereitung der Reagenzien

Fügen Sie 500 µL destilliertes Wasser zu dem lyophilisierten Kontrollserum hinzu. Mischen Sie vorsichtig mit einem Schüttler oder Vortexgerät (Schaumbildung sollte vermieden werden). Versichern Sie sich, dass eine komplette Lösung erhalten wurde und erlauben Sie dieser bei Raumtemperatur mindestens 20 Minuten zu equilibrieren.

Probensammlung und Lagerung

Die Serumproben können nach den gängigen Verfahren, welche routinemäßig in klinischen Laboren verwendet werden, vorbereitet werden. Die Seren können bei 2-8 °C für zwei Tage nach der Sammlung gelagert werden. Für eine spätere Analyse sollten die Seren tiefgefroren gelagert werden.

Testdurchführung

(Kurzanleitung siehe Tabelle 1.)

1. 1. Bringen Sie alle Reagenzien und Serumproben vor Gebrauch für mindestens 1 Stunde auf Raumtemperatur.
2. Beschriften Sie je zwei beschichtete Teströhrchen für jeden Kalibrator (S1-S6), jede Kontrolle (C) und Probe (Sx). Zur Bestimmung der Totalaktivität (T) beschriften Sie optional 2 normale Röhrchen.
3. Homogenisieren Sie alle Reagenzien und Proben durch behutsames Mischen und vermeiden Sie Schaumbildung.
4. Geben Sie 10 µL Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die entsprechend beschrifteten Röhrchen.
5. Geben Sie 500 µL des Tracers in jedes Röhrchen.
6. Geben Sie 500 µL Antiserum in jedes Röhrchen außer in die Totalaktivität.
7. Decken Sie alle Röhrchen mit einer Plastikfolie ab. Fixieren Sie die Halterung mit den Röhrchen sicher auf der Platte des Schüttlers. Wählen Sie eine adäquate Geschwindigkeit um eine gleichmäßige Durchmischung in jedem Röhrchen zu gewährleisten.

8. Inkubieren Sie die Röhrchen für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
9. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab oder dekantieren Sie den Überstand indem Sie den gesamten Ständer umdrehen und für 2 Minuten auf saugfähigem Papier stehen lassen.
10. Messen Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter für mind. 60 Sekunden.
11. Berechnen Sie die Cortisol Konzentrationen der Proben wie unter „Berechnung der Ergebnisse“ beschrieben.

Tabelle 1. Kurzanleitung, Pipettierschema (alle Volumina in µL)

Tubes	T	S ₁₋₆	C	S _x
Kalibrator		10		
Kontrolle			10	
Probe				10
Tracer	500	500	500	500
Antiserum		500	500	500
2 Stunden schütteln bei Raumtemperatur				
Überstand absaugen oder dekantieren				
Messen der Radioaktivität (60 Sek/Röhrchen)				

Berechnung der Ergebnisse

Die Berechnung wird hier unter Verwendung repräsentativer Daten erklärt. Ihre ermittelten Testdaten sollten denen in Tabelle 2 dargestellten ähneln. Berechnen Sie den Mittelwert aus den „counts per minute“ (CPM) für jeden Doppelansatz. Berechnen Sie den Prozentsatz von Bo/T für den Nullstandard (S1) mit Hilfe folgender Formel:

$$B_0/T \% = 100 * S_1(\text{cpm}) / T(\text{cpm})$$

Berechnen Sie mit Hilfe der folgenden Formel, den normalisierten Bindungsprozentsatz für jeden Kalibrator beziehungsweise jede Probe und Kontrolle:

$$B/B_0 \% = 100 * S_{2-6} ; C ; S_x(\text{cpm}) / S_1(\text{cpm})$$

Zur Vereinfachung sind die Werte für die unspezifische Bindung (NSB) nicht korrigiert. Dies wird durch eine geringe NSB von unter 3% der Totalaktivität möglich.

Zeichnen Sie eine Standardkurve, indem Sie den B/B₀ (%) für jeden Kalibrator gegen die dazugehörige Cortisol Konzentration auf semilogarithmischen Millimeterpapier eintragen. Abbildung 1 zeigt eine typische Standardkurve. Berechnen Sie die Cortisol Konzentration für jede unbekannt Probe durch Interpolation aus der Standardkurve. Werte außerhalb des Bereichs der Standardkurve werden nicht extrapoliert. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden.

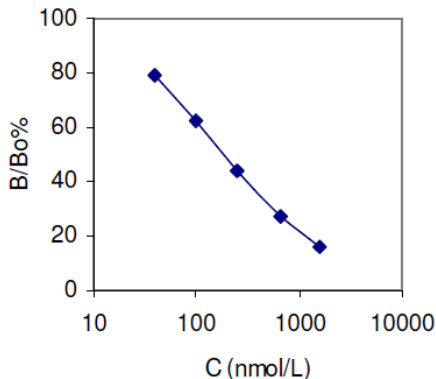
Tabelle 2. Typische Testwerte

Tubes	Counts CPM1	Counts CPM2	Counts CPM	B/T %	B/B ₀ %
T	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
C	19600	18893	19247	21,4	37,2

Abbildung 1.

Typische Standardkurve

(Nicht zur Berechnung der Proben verwenden)



Die Umrechnung von SI Einheiten kann mit Hilfe folgender Formel erfolgen: 1 nmol/L = 0,362 ng/mL

Assay Charakteristika

Assay Parameter

Parameter	Wert
B ₀ /T	56 ± 10 %
ED-50	180±36 nmol/L

Spezifität

Eine Kreuzreaktivität des im Kit verwendeten Cortisol Antiserums mit verschiedenen Substanzen wird im Folgenden gezeigt:

Zugesetzte Steroidkonzentration	70 nM	700 nM
	Offensichtliche Cortisolkonzentration nM	
Corticosterone	6	30
17- α -hydroxyprogesteron	<DL	13
Cortisone	<DL	6
11-deoxycortisol	10	56
Deoxy-corticosterone	<DL	12
Prednisolon	64	428
Dexamethason	<DL	15

Die im Folgenden gezeigten Steroide sind in einer Konzentration bis zu 700 nM nicht detektierbar bei der Bestimmung des Cortisol: 17 β -estradiol, progesterone, 5- α -dihydrotestosterone, 5- β -dihydro-19-nor-testosterone, testosterone, androstenedion, androstenediol, 17- α -methyl-testosterone, androstenediol, aldosterone, pregnenolone, 19-nor-testosterone, dehydroepiandrosterone, estriol, estrone

Sensitivität

Die Sensitivität ist definiert als die niedrigste Konzentration (Nachweisgrenze) ermittelt aus der 2-fachen Standardabweichung vom Null-Standard und beträgt 2,9 nmol/L.

Precision, reproducibility

Inter-assay (7 Assays in 2 rep.)		Intra-assay (1 Assay in 10 rep.)	
Mean	CV%	Mean	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

Wiederfindung

Als Wiederfindung bezeichnet man die erwartete messbare Konzentrationserhöhung einer Serumprobe nach Zugabe von definierten Cortisol Mengen in Prozent („spiking“). Die durchschnittliche Wiederfindung aus 16 Serumproben, welche mit verschiedenen Cortisol Konzentrationen gespickt wurden betrug: 92 ± 7 %/

Erwartete Werte

Es wird darauf hingewiesen, dass jedes Labor eigene Referenzbereiche für sein eigenes Patientenkollektiv ermitteln sollte. Die hier gezeigten erwarteten Werte basieren auf der Messung von scheinbar gesunden Blutspendern (90 Männer und 90 Frauen). **Die Proben wurden zwischen 8-11 Uhr entnommen.** Nach der statistischen Auswertung wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Mittelwert ± SD = 353 ± 139 nmol/L

Absoluter Bereich = 127 – 859 nmol/L

Serum Cortisol Ergebnisse werden normalerweise nach logarithmischer Umwandlung angegeben und der 95% Konfidenzintervall berechnet. **Der Normalbereich für Cortisol basierend auf diesem 95% Intervall beträgt: 147 – 726 nmol/L.**

Zusatzinformationen

Einschränkungen

Die im Kit enthaltenen Reagenzien sind für die Messung der Cortisol Level im Serum und Plasma optimiert.

Vermeiden Sie das Einfrieren und Auftauen der Reagenzien und Proben.

Hämolytische und lipämische Proben können zu falschen Werten führen und sollten nicht verwendet werden.

Es sollten keine Komponenten verschiedener Lots oder von unterschiedlichen Herstellern gemischt oder vertauscht werden.

Dieser Kit sollte nur in der in vitro Diagnostik Anwendung finden.

Lagerung

Lagern Sie die Reagenzien bei 2-8°C. Bei dieser Temperatur ist jedes Reagenz bis zum angegebenen Verfallsdatum des Kits stabil.

Verfügbarkeit:

Lagerbestand.

Haltbarkeit

Das aktuelle Verfallsdatum ist auf der Verpackung und auf dem QC-Datenblatt angegeben.

Warn-und Sicherheitshinweise

Radioaktivität

Dieses Produkt enthält radioaktives Material. Es liegt in der Verantwortung des Nutzers die lokalen Bestimmungen oder gesetzliche Vorschriften die das Umgehen mit radioaktivem Material betreffen einzuhalten.









Potenziell infektiöses Material

Die in diesem Kit verwendeten humanen Blutprodukte stammen von gesunden Spendern. Sie wurden individuell mit anerkannten Methoden (EIA, Enzym Immunassay) negativ auf das Vorhandensein von Humanem Immunodeficiency Virus Antikörper (Anti-HIV-1) und Hepatitis B Oberflächen Antigen (HBsAg) getestet.

Beim Umgang mit humanen Proben die in diagnostischen Kits getestet werden, sollte immer große Sorgfalt walten gelassen werden. Auch wenn eine Person negativ getestet wurde, kann keine Methode komplette Sicherheit gewähren, dass kein Hepatitis B Virus, Human Immunodeficiency Virus (HIV-1), oder andere infektiöse Erreger vorhanden sind. Daher sollten humane Blutproben grundsätzlich wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Chemische Gefährdung

Die Komponenten enthalten Natrium Azid (0,1 % w/v) als antimikrobielles Mittel. Bei der Entsorgung des Abfalls sollte mit ausreichend Wasser nachgespült werden, um die Anhäufung von explosivem metallischem Azid in Kupfer- und Bleirohren zu vermeiden. Die Gesamtmenge von Azid in jedem Paket beträgt 114 mg.

	Mindesthaltbarkeitsdatum	LOT	Chargen-Nr.
	Lagerungstemperatur	CONTROL	Kontroll
	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	CAL	Kalibrator
	Biologisches Risiko	CT	Beschichtetes Rohr
	Gebrauchsanweisung beachten	TRAC	Tracer
	In-vitro-Diagnostikum	AS	Antiserum
	Hersteller	REF	Katalog-Nr.
	Radioaktiv Material		



Website: <http://www.izotop.hu>

Technische e-mail: immuno@izotop.hu

Kommerzielle E-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: (+36) 1-392-2577

Fax: (+36) 1-395-9247

01471