

Инструкции по использованию
Кортизол Моча ELISA



LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Instructions for use
Cortisol Urine ELISA

Инструкция по применению кортизол мочи ELISA

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Конкурентный иммуноферментный колориметрический метод для количественного определения свободного кортизола в моче.

ПРИНЦИП

Кортизол (антиген) в образце конкурирует с антигенным кортизолом конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), для связывания с ограниченным количеством антител анти-кортизол, нанесенными на микропланшете (твердая фаза). После инкубации связанное / свободное разделение осуществляется с помощью простой твердофазной промывки. Затем фермент с пероксидазой хрена в граничной фракции вступает в реакцию с субстратом (H₂O₂) и субстратом TMB и развивает синий цвет, который изменяется в желтый при добавлении стоп-раствора (H₂SO₄).

Интенсивность цвета обратно пропорциональна концентрации кортизола в образце. Концентрация кортизола в образце рассчитывают по калибровочной кривой.

РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Реагенты и материал, поставляемый в комплекте

Стандарты и Контроли

Кат. №.	Символ	калибратор	Концентрация	Объем / колба
MS E-5101	STANDART A	Стандарт 0	0 нг / мл	4,0 мл
MC E-510	STANDART B	Стандарт 1	10 нг / мл	1,0 мл
MC E-5103	STANDART C	Стандарт 2	50 нг / мл	1,0 мл
MS E-5104	STANDART D	Стандарт 3	150 нг / мл	1,0 мл
MS-5105 E	STANDART E	Стандарт 4	500 нг / мл	1,0 мл
MS-5151 E	Control 1	Низкий контроль	См этикетки флаконов для ожидаемого значения и допустимого диапазона!	1,0 мл
MS-5152 E	Control 2	Высокий контроль		1,0 мл

готов к использованию

CONJUGATE-CONC

MS E-5140 Конъюгат концентрат

1 флакон, 33 мл; Кортизол, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP),

MS E-5131 Микропланшет разборной

1 микропланшет разборной; Анти-кортизол-антитело адсорбированный на микропланшет

WASH CONC 10x

MS E-0030 Раствор для промывки

10X Конц, 1 флакон, 50 мл.; Фосфатный буфер 0,2 М, Проклин <0,0015%.

SUBSTRATE

MS E-0055 Раствор субстрата

1 флакон, 15 мл; H₂O₂-ТМБ, 0,26 г / л (избегать любого контакта с кожей)

STOP-SOLN

MS E-0080 Стоп-раствор

1 флакон 15 мл; Серная кислота, 0,15 моль / л (избегать любого контакта с кожей)

Реагенты, необходимые не входит в комплект

Дистиллированная вода

Вспомогательные материалы и приборы

Автоматический дозатор

Ридер микропланшетов (450 нм, 620-630 нм)

Примечания

Хранить все реагенты при 2 ° С - 8 ° С в темноте.

Открывать мешок реагента (микропланшет с покрытием) только тогда, когда он находится при комнатной температуре и закрыть сразу после использования. После открытия микропланшет стабилен до истечения срока годности набора.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для исследовательских целей.
- Используйте соответствующие средства индивидуальной защиты при работе с предусмотренными реагентами,
- Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) для обработки продуктов крови.
- Некоторые реагенты содержат небольшие количества проклин 300 в качестве консерванта. Избегайте контакта с кожей или слизистой оболочкой.
- ТМБ субстрат содержит раздражитель, который может причинить вред при вдыхании, проглатывании или всасывается через кожу. Во избежание травм, избегайте вдыхания, проглатывания или контакта с кожей и глазами.
- Стоп раствор состоит из разбавленного раствора серной кислоты. Серная кислота является ядовитой и разъедающей и может быть токсичной при попадании в организм. Во избежание химических ожогов, избегать контакта с кожей и глазами.
- Избегайте воздействия на реагент ТМБ / H₂O₂ направленного солнечного света, металлов или оксидантов. Не замораживать раствор.
- Этот метод позволяет определять кортизол от 10 нг / мл до 500 нг / мл.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов прокапывания, предусмотренную в данном протоколе.
- Данные о производительности, представленные здесь, были получены с использованием специфических реагентов, перечисленных в настоящей инструкции по применению.
- Все реагенты следует хранить в холодильнике при температуре от 2 ° С до 8 ° С в оригинальной упаковке. Любые исключения четко указаны. Реагенты стабильны до истечения срока годности при хранении и обращении, как указано.
- Разрешается все компоненты набора и образцы нагреть до комнатной температуры (22 ° С 28 ° С) и хорошо перемешать перед применением.
- Не заменяйте компоненты набора из разных партий. Срок годности напечатан на коробке и этикетках ампул и должны быть соблюдены. Не следует использовать любой компонент набора после истечения срока действия.
- При использовании автоматизированного оборудования, пользователь несет ответственность за уверенность, что набор был надлежащим образом проверен.
- Неполное или неточное удаление жидкости из лунок может повлиять на точность анализа

и / или увеличение фона.

- Для повышения производительности набора на автоматических системах рекомендуется увеличить количество промывок.
- Важно, чтобы время реакции в каждую лунку поддерживалось постоянным для воспроизводимых результатов. Время раскапывание образцов не должно превышать десять минут для избежания смещения результатов теста. Если требуется более 10 минут, следовать такому же порядку распределения. Если более чем один планшет, рекомендуется повторить кривую зависимости ответа от дозы в каждой пластине
- Добавление раствора ТМБ субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп-раствора. Таким образом, субстрат ТМБ и стоп-раствор следует добавить в той же последовательности, чтобы исключить любое отклонение времени во время реакции.
- соблюдать руководящие принципы для осуществления контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контрольных образцов .
- Максимальная точность необходима для восстановления и распределения реагентов.
- Ридер микропланшетов измеряет вертикально. Не прикасайтесь к нижней части лунки.

ПРОЦЕДУРА

Подготовка стандарта (S0 - S4)

Перед использованием, оставьте 5 минут на вращающемся миксере.

Стандарты готовы к использованию и имеют следующую концентрацию кортизола:

	S0	S1	S2	S3	S4
нг / мл	0	10	50	150	500

После вскрытия стандарты стабильны 6 месяцев при температуре 2 ° C - 8 ° C.

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТА

Конъюгат готов к использованию.

После открытия стабильны 6 месяцев при температуре 2 ° C - 8 ° C.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Определение кортизола с этим набором следует проводить в образцах мочи.

Важное примечание: набор был разработан для использования на образцах необработанной мочи; подкисление обработки мочи, которые приводят рН до значений ниже 5,0 может помешать анализу и произвести отклоняющиеся результаты.

Не надо разбавлять образец.

Общий объем мочи в течение 24 часов должен быть собран и смешан в одном контейнере.

Образцы мочи, которые не надо анализировать немедленно, следует хранить при температуре от 2 ° C - 8 ° C или при -20 ° C в течение более длительных периодов (не более 6 месяцев).

Контроли готовы к использованию.

В случае образцов с концентрацией, превышающей 500 нг / мл разбавьте Стандарт А (рассмотреть этот разбавление при расчете конечной концентрации).

Приготовление промывочного раствора

Развести содержимое каждого флакона "промывочного раствора" 10X концентрата дистиллированной водой до конечного объема 500 мл перед использованием.

Для небольших объемов соблюдать соотношение 1:10 разбавления.

Разбавленный промывочный раствор стабилен в течение 30 дней при температуре от 2 ° C - 8 ° C. В концентрированном растворе для промывки можно наблюдать присутствие кристаллов; в этом случае смешать при комнатной температуре до полного растворения

кристаллов; для большей точности, разбавьте целую бутылку концентрированного промывочного раствора до 500 мл, следя за тем, чтобы передать полностью кристаллы, а затем перемешать до полного растворения кристаллов .

Процедура

Все реагенты нагреть до комнатной температуры (22 ° C - 28 ° C) в течение по крайней мере 30 минут.

Неиспользованные стрипы с покрытием должны быть упакованы надежно в пакет из фольги, содержащий влагопоглотитель и хранить при температуре от 2 ° C до 8 ° C.

Для того, чтобы избежать возможного загрязнения микробного и / или химического, неиспользованные реагенты не должны быть перемещены обратно в оригинальные флаконы. Необходимо выполнять определение в двух экземплярах, с целью повышения точности результатов испытаний, подготовить две лунки для каждой точки калибровочной кривой (S0-S4), две для каждого Контроля, две для каждого образца, одну для бланка.

Реагент	Стандарты	Образцы/Контроли	Бланк
Стандартный S0-S4	10 мкл		
Образцы / контроли		10 мкл	
Сопряженные (конъюгат)	300 мкл	300 мкл	
<p>Инкубируют при 37 ° C в течение 1 часа.</p> <p>Удалить содержимое из каждой лунки; промыть лунки 3 раза 350 мкл разбавленного промывочного раствора.</p> <p>Важное примечание: во время каждой стадии промывки, осторожно встряхните планшет в течение 5 секунд и удалите излишки раствора, постукивая перевернутым планшетом по абсорбирующему бумажному полотенцу.</p> <p><u>Автоматический вошер:</u> в случае, если вы используете автоматическую мойку, рекомендуется сделать 6 циклов мытья.</p>			
Раствор субстрата	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре (22 ° C - 28 ° C) в течение 15 минут в темноте			
Стоп раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл
<p>Встряхните микропланшет осторожно. Измерьте оптическую плотность (E) при 450 нм против эталонной длины волны 620 630 нм или против Blank в течение 5 минут.</p>			

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна проверять контроли нормальных, высоких и низких уровнях в диапазоне кортизола мочи для мониторинга характеристик анализа. Эти контроли должны рассматриваться в качестве неизвестных и значений, определенных в каждой процедуре теста. графики контроля качества должны быть сохранены для характеристик поставляемых реагентов. Соответствующие статистические методы должны быть использованы для установления тенденций. Каждая лаборатория должна установить границы анализа. Другие параметры, которые следует контролировать включают 80, 50 и 20% перехватывания стандартной кривой для запуска к запуску воспроизводимости. Кроме того, максимальная оптическая плотность должна соответствовать прошлому опыту. Значительное отклонение от обычных показателей указывает на незамеченное изменение в экспериментальных условиях или деградации реагентов набора. Свежие реагенты должны быть использованы для определения причины вариаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средняя абсорбция

Рассчитывают среднее значение оптической плотности (EM) для каждой точки стандартной кривой и каждого образца.

Стандартная кривая

Участок значения оптической плотности (E_m) стандартов (S0-S4) от концентрации. Нарисуйте наиболее подходящую кривую через отмеченные точки (например : Четыре параметра Logistic).

Подсчет результатов

Интерполируйте значения образцов на стандартной кривой, чтобы получить соответствующие значения концентраций выраженные в нг / мл.

Для расчета концентрации кортизола в моче, рассчитать, как указано выше, и скорректировать для общего объема объема мочи, собранной в течение 24 часов:

$$\text{нг / мл} \times \text{объем (мл) мочи 24 ч} / 1000 = \text{мкг Кортизол} / 24 \text{ ч}$$

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Концентрации Кортизола мочи в течение 24 часов, включаются в следующем диапазоне:

50 мкг - 190 мкг / 24 часа

ДИНАМИКА И ХАРАКТЕРИСТИКИ

точность

Intra-анализа вариации

В ходе событий изменения определяли с помощью повторных измерений (20х) трех разных образцов мочи в одном анализе. В анализе изменчивость составляет $\leq 6,5\%$.

Inter-Assay Вариация

Между ходом событий изменения определяли с помощью повторных измерений (10х) трех разных образцов мочи в различных партиях набора. Между анализом вариабельность $\leq 7,2\%$.

Точность

Восстановление 12,5 - 25 - 50 - 100 нг / мл кортизол добавляется к образцу дали среднее значение (\pm стандартное отклонение) $107.48\% \pm 8,16\%$ по отношению к концентрации исходного.

Чувствительность

Наименьшая определяемая концентрация кортизола мочи, которую можно отличить от стандарта А 2,95 нг / мл при 95% доверительном пределе.

Специфичность

Перекрестная реакция антитела, рассчитанного на 50% в соответствии с Авраамом, приведена в таблице:

Кортизол	100 %
Преднизолон	46.2 %
11-дезоксикортизол	4 %
Кортизон	3.69 %
Преднизон	3.10 %
11 α ОН Прогестерон	1 %
Прогестерон	< 0.1 %
Альдостерон	< 0.1 %
Прегненолон	< 0.1 %
17 β Эстрадиол	< 0.1 %
Эстрон 3-solfato	< 0.1 %
Эстриол	< 0.1 %
Тестостерон	< 0.1 %
Спиринолактон	< 0.1 %
DHEA	< 0.1 %
DHEA-S	< 0.1 %
Андростендион	< 0.1 %
Androsterone	< 0.1 %
DHT	< 0.1 %
Даназол	< 0.1 %
Холестерин	< 0.1 %
Дексаметазон	< 0.1 %

Корреляция с RIA

Было проведено сравнение кортизол мочи ИФА с другим коммерчески доступным тестом кортизола мочи. Были проанализированы 100 образцов мочи.

Линейная кривая регрессии рассчитывается следующим образом:

$$Y = 0.90x + 9.95$$

$$r^2 = 0,836$$

УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны быть утилизированы в соответствии с местными правилами.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Фостер, Л. Б. и Dunn, P. T. Clin. Химреагент 20/3 365 (1974)
2. Де Ласерда и др J. Clin. Endocr. и Metab. 36227 (1973)
3. Roller, E. и др Clin. Хим. Acta 66 319 (1976)
4. Кобаяси, Y. и др Стероиды, 32 № 1 (1978)
5. Akarawa, анальный и др. Biochem. 97 248 (1979)

ИСПРАВЛЕНИЕ ПРОБЛЕМ

ОШИБКИ / ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ / ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Нет колориметрической реакции

- не прокапан конъюгат
- загрязнение конъюгатов и / или субстрата
- ошибки при выполнении процедуры анализа (например, случайное прокапывание реагентов в неправильной последовательности или из неправильного флакона и т.д.)

Слишком низкая реакция (слишком низкая ODS)

- неверный конъюгат (например, не из оригинального комплекта)
- время инкубации слишком длинное, температура инкубации слишком низкая

Слишком высокая реакция (слишком высокая ODS)

- неверный конъюгат (например, не из оригинального комплекта)

- время инкубации слишком долгое, температура инкубации слишком высокая
- качество воды для промывочного буфера недостаточное (низкая степень деионизации)
- недостаточная промывка (конъюгаты не должным образом удалены)

Необъяснимое выпадающие

- загрязнение пипеток, наконечников или контейнеров
- недостаточная промывка (конъюгаты не должным образом удалены)
- слишком высоко с прогоном CV%
- реагенты и / или полосы предварительно не подогревали до комнатной температуры перед использованием
- вошер планшетов не моет правильно (предложение: почистить моющую часть)
- слишком высоко между прогоном CV%
- условия инкубации не являются постоянными (время, температура)
- контроли и образцы не были распределены в то же время (с тем же интервалом) (проверьте порядок прокапывания)
- изменение связанных лиц

Условные обозначения:

Температура хранения	Производитель	Содержит достаточно для <N> испытаний
Дата окончания срока действия	Код партии	Только для диагностики в лабораторных условиях!
Обратитесь к инструкции по пользованию	Содержание	СЕ маркировка
Внимание ! осторожно	Каталожный номер	Только для исследовательских целей