

## **MS E-5400 Кортикостерон ИФА**

Набор реагентов для ИФА для количественного определения Кортикостерона в плазме и сыворотки.

Только для in vitro диагностики.

Кортикостерон ИФА представляет собой твердофазный метод иммуноферментного анализа (ИФА), основанный на принципе конкурентного связывания. Лунки покрыты поликлональными антителами к антигенам, расположенным на молекуле кортикостерона. Эндогенный кортикостерон в образце пациента конкурирует с конъюгированными кортикостерон-HRP (пероксидаза хрена) для связывания с иммобилизованными антителами. После инкубации не связавшийся конъюгат вымывается. Количество связанного конъюгата обратно пропорционально концентрации кортикостерона в образце. После добавления раствора ТМБ-субстрата, интенсивность цвета обратно пропорциональна концентрации кортикостерона в образце пациента.

### **ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ**

Все реагенты необходимо хранить при температуре 2 – 8 °С в течение всего срока годности. Не используйте компоненты набора по истечении срока годности, указанного на этикетке.

Открытые реагенты должны храниться при температуре 2-8 ° С. Микротитровальный планшет должен храниться при температуре 2-8 ° С в плотно закрытом фольгированном пакете.

### **МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА**

Микропланшет	12x8 (разборный) стрипов, 96 лунок Лунки покрыты анти-Кортикостерон антителами (поликлональными)
Стандарты	0-6, 7 флаконов, по 1 мл, готовы к использованию Концентрация: 0, 5, 15, 30, 60, 120, 240 нмоль/л; Пересчет: 1 нмоль /л = 34,646 нг/дл. = 0,34646 нг/мл содержат 0,3% проклин в качестве консерванта
Ферментный конъюгат	Концентрат 250x; 1 флакон, 150 мкл Кортикостерон конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) См. подготовка реагентов
Раствор для разведения конъюгата	1 флакон, 25 мл, готов к использованию
Раствор субстрата	1 флакон, 25 мл, готов к использованию Тетраметилбензидин (ТМБ)
Стоп-раствор	1 флакон, 14 мл, готов к использованию Содержит серную кислоту. Избегайте контакта со стоп-раствором. Это может вызвать ожоги и раздражение кожи.
Промывочный раствор	1 флакон, 30 мл, концентрат 40x См. подготовка реагентов

### **НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА**

- Откалиброванные прецизионные микропипетки переменного объема (например, 10-100 мкл/100-1000 мкл)
- Вошер (рекомендуется)
- ИФА анализатор, способный измерять оптическую плотность при 450 нм и 620 или 650 нм
- Абсорбирующий материал (бумажные полотенца)
- Дистиллированная вода

### **ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

Перед использованием все реагенты и необходимое количество стрипов должны быть комнатной температуры.

**Промывочный раствор:**

Добавьте к 30 мл концентрата промывочного раствора 1170 мл деионизированной воды, до конечного объема 1 200 мл.

Разведенный промывочный раствор стабилен 2 недели при комнатной температуре.

**Ферментный конъюгат:**

Разведите концентрат ферментного конъюгата раствором для разведения конъюгата в соотношении 1 + 250.

Данный раствор должен быть свежеприготовленным.

Если будет использоваться весь микропланшет, то разведите 100 мкл концентрированного конъюгата с 25 мл раствора для разведения конъюгата.

Если не будет использоваться весь микропланшет, то приготовьте только необходимое количество раствора конъюгата.

**ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ**

Для данного анализа используется сыворотка или ЭДТА плазма.

Не используйте гемолизированные, желтушные и липемические образцы.

Не используйте образцы содержащие азид натрия.

Хранение: не более 24 часов при температуре 2 – 8 °С,

Возможно более длительное хранение однократно замороженных образцов при – 20 ° С.

Размораживание должно проводиться непосредственно перед исследованием.

**Разведение образцов:**

Если при анализе установлено, что образец содержит более высокую концентрацию, чем стандарты, то образцы можно разбавить Стандарт 0 и провести повторное исследование, как описано в процедуре анализа.

При расчете результата должен учитываться фактор разведения

Пример:

а) разведение 1:10: 10 мкл Образца + 90 мкл Стандарт 0 (тщательно перемешать)

б) разведение 1:100: 10 мкл разведения а) + 90 мкл Стандарт 0 (тщательно перемешать)

**ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

Общая информация:

- Перед применением все реагенты должны быть комнатной температуры. Все реагенты необходимо тщательно смешать без образования пены.

- Как только процедура анализа была начата, она должна быть завершена без перерыва.

- Используйте одноразовые наконечники пипеток для каждого стандарта, контроля и образца

- ОП является функцией от инкубации и температуры. Рекомендуется перед началом анализа подготовить все реагенты, снять крышки, закрепить лунки и т.д. Это позволит обеспечить равные интервалы времени на каждом этапе пипетирования.

- как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

**Кортикостерон ИФА**

**каждый анализ должен проводиться с построение новой калибровочной кривой.**

1. Закрепите необходимое количество стрипов на штативе.
2. Добавьте по 20 мкл стандартов, контролей и образцов в соответствующие лунки новыми одноразовыми наконечниками.
3. Добавьте по 200 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.

4. Тщательно перемешайте в течение 10 секунд. Важно добиться полного смешивания на этом этапе.
5. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.
6. Резко вытряхните содержимое лунок.  
Промойте каждую лунку 3 раза разведенным промывочным раствором (по 400 мкл на лунку). Для удаления остатков жидкости резко переверните планшет и прижмите к абсорбирующей бумаге.  
Важно: чувствительность и точность данного анализа зависит от правильного выполнения процедуры промывки.
7. Добавьте по 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку
8. Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
9. Для остановки ферментной реакции добавьте по 50 мкл Стоп-раствора в каждую лунку.
10. Измерьте ОП на микропланшетном анализаторе при  $450 \pm 10$  нм в течение 10 минут после добавления стоп-раствора.

### РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого стандарта, контроля и неизвестного
2. Нарисуйте калибровочную кривую на логарифмической бумаге со средней оптической плотности на Y-оси и концентрацией калибратора на X-оси. Если для анализа используется программное обеспечение, то рекомендуется кривая на 4-параметра.
3. Рассчитайте значение неизвестных при помощи калибровочной кривой.
4. Если концентрация образца выше стандартов, то образец должен быть разведен. При расчете результата необходимо учитывать фактор разведения.

Пример типичной стандартной кривой:

(не используйте для расчета)

Стандарт	ОП (450 нм)
Стандарт 0 (0 нмоль/л)	2.31
Стандарт 1 (5 нмоль/л)	1.69
Стандарт 2 (15 нмоль/л)	1.35
Стандарт 3 (30 нмоль/л)	1.10
Стандарт 4 (60 нмоль/л)	0.87
Стандарт 5 (120 нмоль/л)	0.63
Стандарт 6 (240 нмоль/л)	0.48

Ожидаемые нормальные значения:

Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определяла свои границы нормальных и аномальных значений.

При исследовании явно нормальных здоровых взрослых наблюдались следующие значения:

N	5% перцентиль	95% перцентиль
74	6,53 нмоль /л	31,09 нмоль /л
	226,24 нг/дл	1077,14 нг/дл

Динамический диапазон анализа: 0 – 240 нмоль /л

Чувствительность: < 1,631 нмоль /л