

## Instructions for use

# Cortisol Urine ELISA

Інструкція по застосуванню

**КОРТИЗОЛ СЕЧІ ELISA**

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,  
тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

**REF**

**MS E-5100**



**IVD**

## ПРИЗНАЧЕННЯ

Конкурентний імуоферментний колориметрический метод для кількісного визначення вільного кортизолу в сечі.

## ПРИНЦИП

Кортизол (антиген) в зразку конкурує з антигенними кортизолом кон'югованим з пероксидазою хрому (HRP), для зв'язування з обмеженою кількістю антитіл анти- кортизол, нанесеними на мікропланшет (тверда фаза). Після інкубації пов'язане / вільне поділ здійснюється за допомогою простого твердофазного промивання. Потім фермент з пероксидазою хрому в зв'язаній фракції вступає в реакцію з субстратом (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) і субстратом ТМВ і розвиває синій колір, який змінюється в жовтий при додаванні стоп-розчину (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Інтенсивність кольору обернено пропорційна концентрації кортизолу в зразку. Концентрація кортизолу в зразку розраховують по калібрувальній кривій.

## РЕАГЕНТИ, МАТЕРІАЛИ ТА ІНСТРУМЕНТАРІЙ

Реагенти та матеріал, що постачаються в наборі

### Стандарти і Контролі

Кат. №.	Символ	калібратор	Концентрація	Об'єм / флакон
MS E-5101	STANDART A	Стандарт 0	0 нг / мл	4,0 мл
MS E-5102	STANDART B	Стандарт 1	10 нг / мл	1,0 мл
MS 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	Низький контроль	Див етикетки флаконів	1,0 мл
MS-5152	Control 2	Високий контроль	для очікуваного значення і допустимого діапазону!	1,0 мл

готовий до використання

### CONJUGATE-CONC MS E-5140 кон'югата концентрат

1 флакон, 33 мл; Кортизол, кон'югований з пероксидазою хрому (HRP),

### MS E-5131 мікропланшет розбірний

1 мікропланшет розбірний; Анти-кортизол-антитіло адсорбований на мікропланшет

### WASH CONC 10x

#### MS E-0030 Розчин для промивання

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

### SUBSTRATE

#### MS E-0055 Розчин субстрату

1 флакон, 15 мл; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ТМБ, 0,26 г / л (уникати будь-якого контакту зі шкірою)

### STOP-SOLN

#### MS E-0080 Стоп-розчин

1 флакон 15 мл; Сірчана кислота, 0,15 моль / л (уникати будь-якого контакту зі шкірою)

### Реагенти, необхідні не надані

Дистильована вода

### Допоміжні матеріали та прилади

автоматичний дозатор

Рідер мікропланшетів (450 нм, 620-630 нм)

### Примітки

Зберігати всі реагенти при 2 ° C - 8 ° C в темряві.

Відкривати пакет реагентів (мікропланшет з покриттям) тільки тоді, коли він перебуває при кімнатній температурі і закрити відразу після використання. Після відкриття мікропланшет зберігає стабільність до закінчення терміну придатності набору.

### ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Даний набір призначений тільки для дослідницьких цілей.
- Використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту при роботі з передбаченими реагентами,
- Дотримуйтесь належної лабораторної практики (GLP) для обробки продуктів крові.
- Деякі реагенти містять невеликі кількості проклін 300 в якості консерванту. Уникайте контакту зі шкірою або

слизовою оболонкою.

- ТМБ субстрат містить подразник, який може завдати шкоди при вдиханні, ковтанні або всмоктується через шкіру. Щоб уникнути травм, уникайте вдихання, проковтування або контакту зі шкірою та очима.
- Стоп розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота є отруйною та роз'їдає і може бути токсичною при попаданні в організм. Щоб уникнути хімічних опіків, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Не піддавайте реагент ТМБ / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> прямому сонячному світлу, металам або оксидантам. Не заморожувати розчин.
- Цей метод дозволяє визначати кортизол від 10 нг / мл до 500 нг / мл.

## ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

- будь ласка, виконуйте послідовність кроків прокапування, передбачену в даному протоколі.
- Дані про продуктивність, представлені тут, були отримані з використанням специфічних реагентів, перелічених у цій інструкції по застосуванню.
- Всі реагенти слід зберігати в холодильнику при температурі від 2 ° С до 8 ° С в оригінальній упаковці. Будь-які винятки чітко вказані. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності при умові зберігання та обертання, як зазначено.
- Дозволяється все компоненти набору і зразки нагріти до кімнатної температури (22 ° С 28 ° С) і добре перемішати перед застосуванням.
- не замінійте компоненти набору з різних партій. Термін придатності надрукований на коробці і етикетках ампул і повинен бути дотриманий. Не слід використовувати будь-який компонент набору після закінчення терміну дії. При використанні автоматизованого обладнання, користувач несе відповідальність за впевненість, що набір був належним чином перевірений.
- Неповне або неточне видалення рідини з лунок може вплинути на точність аналізу і / або збільшення фону.
- Для підвищення продуктивності набору на автоматичних системах рекомендується збільшити кількість промивок.
- Важливо, щоб час реакції в кожному лунку підтримувався постійним для відтворюваних результатів. Час розкопування зразків не повинен перевищувати десять хвилин для запобігання зсув результатів тесту. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуватися такого ж порядку розподілу. Якщо більш ніж один планшет, рекомендується повторити криву залежності відповіді від дози в кожному планшеті
- Додавання розчину ТМБ субстрату ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп-розчину. Таким чином, субстрат ТМБ і стоп-розчин слід додати в тій же послідовності, щоб виключити будь-яке відхилення часу під час реакції.
- дотримуватися керівних принципів для здійснення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контрольних зразків.
- Максимальна точність необхідна для відновлення і розподілу реагентів.
- Рідер мікропланшетів вимірює вертикально. Не торкайтесь нижньої частини лунки.

## ПРОЦЕДУРА

### Підготовка стандарту (S0 - S4)

Перед використанням, залиште 5 хвилин на обертовому міксері.

Стандарти готові до використання і мають наступну концентрацію кортизолу:

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

Після розчину стандарти стабільні 6 місяців при температурі 2 ° С - 8 ° С.

### ПІДГОТОВКА кон'югата

Кон'югат готовий до використання.

Після відкриття стабільний 6 місяців при температурі 2 ° С - 8 ° С.

### ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

Визначення кортизолу з цим набором слід проводити в зразках сечі.

**Важливе зауваження:** набір був розроблений для використання на зразках необробленої сечі; обробка сечі підкисленням, яка призводить рН до значень нижче 5,0 може перешкодити аналізу і зробити результати, що відхиляються.

Не треба розбавляти зразок.

Загальний обсяг сечі протягом 24 годин повинен бути зібраний і змішаний в одному контейнері.

Зразки сечі, які не треба аналізувати негайно, слід зберігати при температурі від 2 ° С - 8 ° С або при -20 ° С протягом більш тривалих періодів (не більше 6 місяців).

Контролі готові до використання.

У разі зразків з концентрацією, що перевищує 500 нг / мл розбавте Стандарт А (розглянути це розбавлення при розрахунку кінцевої концентрації).

### Приготування розчину для промивання

Розвести вміст кожного флакона "промивного розчину" 10X концентрату дистильованою водою до кінцевого об'єму 500 мл перед використанням.

Для невеликих обсягів дотримуватися співвідношенні 1:10 розведення.

Розведений розчин для промивання стабільний протягом 30 днів при температурі від 2 ° C - 8 ° C. У концентрованому розчині для промивання можна спостерігати присутність кристалів; в цьому випадку змішати при кімнатній температурі до повного розчинення кристалів; для більшої точності, розбавте цілу пляшку концентрованого розчину для промивання до 500 мл, стежачи за тим, щоб передати повністю кристали, а потім перемішати до повного розчинення кристалів.

### Процедура

Всі реагенти нагріти до кімнатної температури (22 ° C - 28 ° C) протягом принаймні 30 хвилин.

Невикористані стріпи з покриттям повинні бути упаковані надійно в пакет з фольги, що містить осушувач і зберігати при температурі від 2 ° C до 8 ° C.

Для того, щоб уникнути можливого забруднення мікробного і / або хімічного, невикористані реагенти не повинні бути переміщені назад в оригінальні флакони.

Необхідно виконувати визначення в двох примірниках, з метою підвищення точності результатів випробувань, підготувати дві лунки для кожної точки калібрувальної кривої (S0-S4), дві для кожного Контролю, дві для кожного зразка, одну порожню.

Реагент	Стандарти	зразки/Контролі	порожня
Стандарт S0-S4	10 мкл		
Зразки/контролі		10 мкл	
Кон'югат	300 мкл	300 мкл	

Інкубують при 37 ° C протягом 1 години.

Видалити вміст з кожної лунки; промити лунки 3 рази 350 мкл розведеного розчину для промивання.

**Важливе зауваження:** під час кожної стадії промивання, обережно струсіть планшет протягом 5 секунд і видаліть надлишки розчину, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбентному паперовому рушнику.

**Автоматичний вошер:** в разі, якщо ви використовуєте автоматичну мийку, рекомендується зробити 6 циклів миття.

<i>Розчин субстрату</i>	<i>100 мкл</i>	<i>100 мкл</i>	<i>100 мкл</i>
<i>Інкубуйте при кімнатній температурі (22 ° C - 28 ° C) на протязі 15 хвилин в темряві</i>			
<i>Стоп розчин</i>	<i>100 мкл</i>	<i>100 мкл</i>	<i>100 мкл</i>
<i>Встряхніть мікропланшет обережно. Виміряти оптичну щільність (E) при 450 нм проти референтної довжини хвилі 620 630 нм или проти порожньої лунки на протязі 5 хвилин.</i>			

### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі нормальних, високих і низьких рівнів в діапазоні кортизолу сечі для моніторингу характеристик аналізу. Ці контролі повинні розглядатися в якості невідомих і значень, визначених в кожній процедурі тесту. Графіки контролю якості повинні бути збережені для характеристик наданих реагентів. Відповідні статистичні методи повинні бути використані для встановлення тенденцій. Кожна лабораторія повинна встановити межі аналізу. Інші параметри, які слід контролювати включають 80, 50 і 20% перехоплювання стандартної кривої для запуску до запуску відтворюваності. Крім того, максимальна оптична щільність повинна відповідати минулому досвіду. Значне відхилення від звичайних показників вказує на непомічену зміну в експериментальних умовах або деградації реагентів набору. Свіжі реагенти повинні бути використані для визначення причини варіацій.

### РЕЗУЛЬТАТИ

#### Середня абсорбція

Розраховують середнє значення оптичної щільності (EM) для кожної точки стандартної кривої і кожного зразка.

#### стандартна крива

Нанесіть значення оптичної щільності (Em) стандартів (S0-S4) навпроти концентрації. Намалюйте найбільш підходящу криву через відмічені точки (наприклад: Чотири параметра Logistic).

#### підрахунок результатів

Інтерполують значення зразків на стандартній кривій, щоб отримати відповідні значення концентрацій виражені в нг / мл.

Для розрахунку концентрації кортизолу в сечі, розрахувати, як зазначено вище, і скорегувати для загальний обсяг

сечі, зібраної протягом 24 годин:

нг / мл x обсяг (мл) сечі 24 год / 1000 = мкг Кортизол / 24 год

## **НОРМАЛЬНІ ЗНАЧЕННЯ**

Концентрації Кортизола сечі протягом 24 годин, включаються в наступному діапазоні:

50 мкг - 190 мкг / 24 години

## **ДИНАМІКА І ХАРАКТЕРИСТИКИ**

### **точність**

#### **варіабельність в аналізі**

варіабельність в аналізі визначали за допомогою повторних вимірів (20х) трьох різних зразків сечі в одному аналізі. В аналізі мінливість становить  $\leq 6,5\%$ .

#### **варіабельність між аналізами**

Між аналізами варіабельність визначали за допомогою повторних вимірів (10х) трьох різних зразків сечі в різних партіях набору. Між аналізом варіабельність  $\leq 7,2\%$ .

### **точність**

Відновлення 12,5 - 25 - 50 - 100 нг / мл кортизол додається до зразка що дає середнє значення ( $\pm$  стандартне відхилення)  $107,48\% \pm 8,16\%$  по відношенню до оригінальної концентрації .

### **Чутливість**

Найменша концентрація, що визначається, кортизолу сечі, яку можна відрізнити від стандарту А 2,95 нг / мл при 95% довірчій межі.

### **специфічність**

Перехресна реакція антитіла, розрахованого на 50% відповідно до Авраам, приведена в таблиці:

Кортизол 100%

Преднізолон 46.2%

11-дезоксикортизол 4%

Кортизон 3.69%

Преднізон 3.10%

11 $\alpha$ ОН Прогестерон 1%

Прогестерон <0.1%

Альдостерон <0.1%

Прегненолон <0.1%

17 $\beta$  естрадіолу <0.1%

Естрон 3-solfato <0.1%

Естріол <0.1%

Тестостерон <0.1%

Спіронолактон <0.1%

DHEA <0.1%

DHEA-S <0.1%

Андростендіон <0.1%

Androsterone <0.1%

DHT <0.1%

Даназол <0.1%

Холестерин <0.1%

Дексаметазон <0.1%

### **Кореляція з RIA**

Було проведено порівняння кортизол сечі ІФА з іншим комерційно доступним тестом кортизолу сечі. Були проаналізовані 100 зразків сечі.

Лінійна крива регресії розраховується наступним чином:

$$Y = 0.90x + 9.95$$

$$r^2 = 0,836$$

### **УТИЛІЗАЦІЯ ВІДХОДІВ**

Реагенти повинні бути утилізовані відповідно до місцевих нормативних документів.

### **БІБЛІОГРАФІЯ**

1. Фостер, Л. Б. і Dunn, Р. Т. Clin. Хімреагентів 20/3 365 (1974)

2. Де Ласерда та ін J. Clin. Endocr. i Metab. 36227 (1973)
3. Rolleri, E. i ін Clin. Chim. Acta 66 319 (1976)
4. Кобаясі, Y. i ін Стероїди, 32 № 1 (1978)
5. Акаґаґа, анальний і ін. Biochem. 97 248 (1979)

**Виправлення ПРОБЛЕМ  
ПОМИЛКИ / МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ / ПРОПОЗИЦІЇ**

**Немає колориметрической реакції**

- НЕ прокапали кон'югат
- забруднення кон'югатів і / або субстрату
- помилки при виконанні процедури аналізу (наприклад, випадкове прокапування реагентів в неправильній послідовності або з неправильного флакона і т.д.)

**Занадто низька реакція (дуже низька ОЩ)**

- невірний кон'югат (наприклад, не з оригінального набору)
- час інкубації занадто довгий, температура інкубації занадто низька

**Занадто висока реакція (дуже висока ОЩ)**

- невірний кон'югат (наприклад, не з оригінального набору)
- час інкубації занадто довгий, температура інкубації занадто висока
- якість води для промивання буфера недостатня (низький ступінь деіонізації)
- недостатня промивка (кон'югати не належним чином видалені)

**Незрозумілі відхилення**

- забруднення піпеток, наконечників або контейнерів
- недостатня промивка (кон'югати не належним чином видалені)
- занадто висока в аналізі CV%
- реагенти і / або стріпи попередньо не підігрівали до кімнатної температури перед використанням
- вошер планшетів не миє правильно (пропозиція: почистити миючу частину)
- занадто висока між аналізами CV%
- умови інкубації не є постійними (час, температура)
- контролю та зразки не розподіляються одночасно (з однаковими інтервалами) (перевірте порядок прокапування)
- варіабельність, пов'язана з особами

**Умовні позначення:**

 <p>Температура зберігання</p>	 <p>Виробник</p>	 <p>Містить достатньо для &lt;N&gt; випробувань</p>
 <p>Дата закінчення строка дії</p>	<p>LOT Код партії</p>	<p>IVD Тільки для діагностики в лабораторних умовах!</p>
 <p>Звертайтеся до інструкції по експлуатації</p>	<p>CONT зміст</p>	 <p>Маркіровка</p>