

INTENCIÓN DE USO

Para uso exclusivo en investigación. No debe utilizarse en los procedimientos de diagnóstico.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Pocillos revestidos con Estreptavidina	12x8x1
2. Anticuerpo Biotinilado ACTH (Reactivo 1)	2.7 ml
3. Peroxidasa (enzima) marcado con ACTH de anticuerpos (1 Vial)	2.7 ml
4. Concentrado de lavado (1 Vial)	30 ml
5. Sustrato TMB (1 Vial)	15 ml
6. Solución de Paro (1 Vial)	20 ml
7. Calibradores (5 viales)	2 ml
8. Calibrador Cero (1 Vial)	4 ml
9. Controles 1&2 (CTRL) (2 Viales)	2 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450 nm.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en una bolsa seca con desecantes.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso exclusivo en investigación. No debe utilizarse en los procedimientos de diagnóstico.
2. Para uso en laboratorio.
3. Los materiales de potencial riesgo biológico:
El calibrador y los controles contienen componentes de fuente humana, que se han probado y no son reactivos al antígeno de superficie de la hepatitis B, así como de anticuerpos del VIH con reactivos con licencia FDA. Sin embargo, como no existe un método de prueba que puede garantizar la completa seguridad de que el VIH, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos, estos reactivos deben ser manejados al Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manual "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos.
4. Los resultados óptimos se obtienen mediante la estricta adhesión al protocolo de prueba, así como después de la hora exacta y el requisito de temperatura son esenciales.

5. No pipetear con la boca. No fumar, comer o beber en las áreas en las que las muestras o los reactivos del kit se manipulen.
6. Los componentes de este kit están destinados para su uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben ser mezclados. Este producto contiene componentes preservados con azida de sodio. La azida sódica puede reaccionar con plomo y cobre y formar ácidos metálicos explosivos. Para su eliminación, lavar con un gran volumen de agua. Mantener los reactivos a temperatura ambiente.
7. Muestras forenses viscosas siempre deben ser diluidas en tampón fosfato salino o agua destilada antes de dispensar.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. La determinación de ACTH se debe realizar en plasma EDTA.
2. Para ensayo de la muestra por duplicado, se requiere 400 µl de plasma con EDTA.
3. Recoger la sangre entera en un tubo de lavanda [EDTA].
4. El plasma debe ser separado rápidamente, preferiblemente en una centrífuga refrigerada, y se almacena a -20°C o inferior.
5. Las muestras de plasma EDTA se pueden almacenar hasta 8 horas a 2-8 ° C.
6. Las muestras de plasma EDTA congeladas a -20°C son estables durante hasta 4 meses.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Almacenar todos los componentes del kit a 2-8°C, excepto concentrado para lavado y la solución de paro.

1. Todos los reactivos excepto los calibradores no cero, los controles del ensayo y la solución de lavado están listos para el uso. Guarde todos los reactivos a 2-8°C, excepto la solución de lavado, que debe mantenerse a temperatura ambiente hasta que la dilución para evitar la precipitación.
2. Para cada uno de los calibradores no cero (calibrador B a F) y kit de Control 1 y 2, Reconstituir cada vial con 2 ml de agua destilada o desionizada y mezclar. Dejar que el vial reposar durante 10 minutos y luego mezclar bien por inversión suave para asegurar la reconstitución completa. Usa los calibradores y los controles tan pronto como sea posible después de la reconstitución. Congelación (-20°C) los calibradores y los controles restantes tan pronto como sea posible después de su uso. Calibradores y los controles son estables a -20°C durante 6 semanas después de la reconstitución con los ciclos de descongelación hasta el 3 de congelación cuando se manipula como se recomienda en la sección "Notas sobre el procedimiento".
3. Reactivo A ELISA: Concentrado de lavado: Mezcle los contenidos de concentrado de lavado a fondo. Si precipitado está presente en el concentrado de lavado debido a un almacenamiento a temperatura inferior, tal como 4°C, se disuelve colocando el vial en un baño de agua a 37°C o en el horno con turbulencia o agitación. Añadir el concentrado de lavado (30 ml) a 570 ml de agua destilada o desionizada y mezclar. La solución de lavado de trabajo diluida es estable durante 90 días cuando se almacena a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Traer todas las muestras y reactivos a temperatura ambiente (20-25°C) y mezclar suavemente.
2. Colocar suficientes tiras recubiertas con Estreptavidina en un soporte para ejecutar los seis (6) calibradores de ACTH, A - F de los calibradores de ACTH (concentración viene indicada en la etiqueta del vial), control de calidad de plasma y muestras de pacientes.
3. Pipetear 200 µl de muestra en el designado o bien mapeada. Congelación (-20°C) los calibradores y los controles restantes tan pronto como sea posible después de su uso.
4. Añadir o dispensar 25 µl de Reactivo 1 (anticuerpo biotinilado) en cada uno de los pocillos que ya contienen la muestra.
5. Agregar o dispensar 25 µl de reactivo 2 (anticuerpo marcado) en cada uno de los mismos pozos. Cubrir la placa (s) con papel de aluminio o una bandeja para evitar la exposición a la luz, y lo coloca en un agitador o rotador conjunto orbital a 170 rpm + 10 + durante 4 horas y 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).
6. En primer lugar aspirar el líquido completamente y lavar / Aspirar cada pocillo cinco (5) veces con la solución de lavado de trabajo (preparado a partir de Reactivo A), utilizando un lavador de microplacas automático. El volumen de solución de lavado se debe establecer para dispensar 0,35 ml en cada pocillo.
7. Añadir o dispensar 150 µl de la ELISA Reactivo B (Sustrato TMB) en cada uno de los pocillos.
8. Con la cubierta adecuada para evitar la exposición a la luz, colocar la microplaca (s) en un agitador orbital o el conjunto de los rotadores a 170 + 10 rpm durante 5-30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
9. Agregar o dispensar 100 µl de la solución de parada en cada uno de los pozos y mezclar suavemente.
10. Leer la absorbancia de la solución en los pocillos dentro de los 10 minutos, utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm frente a 250 ml de agua destilada o desionizada. Leer la placa de nuevo con el lector ajustado a 405 nm frente a agua destilada o desionizada. Nota: La segunda lectura está diseñado para extender la validez analítica de la curva de calibración al valor representado por el calibrador más alto, es decir, aproximadamente 500 pg / ml. Por lo tanto, las muestras de pacientes con ACTH > 150 pg / ml pueden cuantificarse frente a una curva de calibración que consiste en las lecturas de todo el camino hasta la concentración equivalente a la del calibrador más alto usando la lectura 405 nm, lejos de la longitud de onda de máxima absorción. En general, las muestras de pacientes y de control deben ser leídos usando la nm 450 para concentraciones de ACTH de hasta 150 pg / ml. Las concentraciones de ACTH por encima de 150 pg / ml deben ser interpolados mediante la lectura de 405 nm.
11. Mediante el uso de los valores de absorbancia finales obtenidos en el paso anterior, construir una curva de calibración a través del spline cúbico, de los parámetros, o de la interpolación punto a punto para cuantificar la concentración de la ACTH.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. A los 450 nm de lecturas, construir una curva de respuesta a la dosis (curva de calibración) utilizando los primeros cinco calibradores proporcionado, es decir, los calibradores A, B, C, D y E. Para los 405 nm de lecturas, construir una segunda curva de respuesta a la dosis usando el tres calibradores con las concentraciones más altas, es decir, calibradores D, E y F.
2. Asignar la concentración de cada calibrador indicada en el vial en pg / ml. Representar gráficamente los datos de la curva de calibración en el papel de gráfico lineal con la concentración en el eje "X" y el correspondiente A.U. en el eje "Y".
3. Dibujar una línea recta entre 2 puntos adyacentes. Este algoritmo matemático se conoce comúnmente como el cálculo " punto a punto". Se obtiene la concentración de la muestra mediante la localización de la unidad de absorbancia en el eje "Y" y encontrar el valor de la concentración correspondiente en el eje "X". Las muestras de pacientes y de control deben ser leídos con el 450 nm para las concentraciones de ACTH hasta 150 pg / ml. Las concentraciones de ACTH por encima de 150 pg / ml deben ser interpolados mediante la lectura de 405 nm.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. El kit ELISA ACTH ha expuesto ningún "efecto de gancho de dosis alta" con las muestras se trataron con 20.000 pg / ml de ACTH. Las muestras con niveles de ACTH mayores que el calibrador más alto, sin embargo, deben ser diluidos y volver a ensayar para obtener los valores correctos.

REFERENCIAS

1. Ryan, WG: Endocrine Disorders – A Pathophysiologic Approach, 2nd Edition Year Book Medical Publishers, Inc. 1980.
2. Watts, N.B., J.H. Keffer: Practical Endocrine Diagnosis, Third Edition, Lea and Febioer, 1982.
3. Ganong, WF. L.D. Alber, TC Lee: ACTH and the Regulation of Adrenocortical Secretion, N. Engl. J. Med. 290: 1006, 1974.
4. Tepperman, J: Metabolic and Endocrine Physiology, 4th Edition, Year Book Medical Publishers, Inc., 1981.
5. Odell, W.D., R. Horton, M.R. Pandian, J. Wong: The Use of ACTH and Cortisol Assays in the Diagnosis of Endocrine Disorders. Nichols Institute Publication, 1989.
6. Radioimmunoassay Manual, Edited by A.L. Nichols and J.C. Nelson, 4th Edition Nichols Institute, 1977.
7. Gold, E.M.: The Cushing's Syndromes: Changing Views of Diagnosis and Treatment. Ann Intern. Med. 90:829, 1979.
8. Plasma Cortisol, RIA for Physicians, Edited by J.C. Travis, 1:8, Scientific Newsletter, Inc. 1976.
9. Krieger, D.T.: Physiopathology of Cushing's Disease, Endocrine Review 4:22-43, 1983.