



**Набор ИФА
для прямого количественного
определения
АЛЬДОСТЕРОНА
в сыворотке человека**

Кат. № : EIA-4600
Количество тестов : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 16-07-2010
Версия 7.0

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Для прямого количественного определения альдостерона методом иммуноферментного анализа в сыворотке человека.

Только для диагностики *in vitro*.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Принцип приведенного ниже анализа основан на простом конкурентом связывании. Конкуренция происходит между мечеными антигенами (присутствующими в стандартах, контролях и образцах пациентов) и антигенами с ферментной меткой (конъюгат) за ограниченное количество свободных связей антител на микропланшетной лунке. Несвязанный материал удаляется при промывке и следующем за промывкой удалении остатков влаги. Затем добавляется ферментный субстрат. Ферментативная реакция прекращается при добавлении стоп-раствора. Абсорбция измеряется на микропланшетном считывателе. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации альдостерона в образце. Набор стандартов используется для построения стандартной кривой, с которой можно считать концентрацию альдостерона в образцах пациента и контролях.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Альдостерон - это сильнодействующий минеральный кортикоид, освобождение и синтез которого контролируются ренин-гипертензивной системой тела. Альдостерон стимулирует реабсорбцию натрия в дистальных каналах почек, что позже приводит к секреции калия и сохранению натрия, которые контролируют циркуляцию всего объема крови. Хроническое перепроизводство и секреция альдостерона ведет к повышенному кровяному давлению. Измерение уровней альдостерона в сыворотке вместе с уровнями плазмы ренин можно использовать для того, чтобы различать между первичным и вторичным альдостеронизмом.

Кондиция	Сыворотка альдостерона	Ренин плазмы
Первичный альдостеронизм	Высокий	Низкий
Вторичный альдостеронизм	Высокий	Высокий

Измерение альдостерона при помощи селективного подавления и стимуляционного теста можно использовать для следующего распределения первичного альдостерона на два базовых типа:

- 1) первичный альдостеронизм, возникший после аденомы одной или обоих надпочечников
- 2) первичный альдостеронизм, возникший на основании надпочечной гиперплазии

Дифференциация важна для лечения и умения справиться с этой болезнью. Надпочечные аденомы хорошо лечатся хирургией ВТО время как заболевание гиперплазии надпочечников в основном лучше лечится с помощью лекарств. Следовательно, точное и правильное измерение сыворотки альдостерона с помощью иммуноферментного анализа может быть важным дополнением до лабораторного диагностирования различных гипертонических болезней.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Потребители должны иметь полное понимание этой инструкции, для того чтобы успешно использовать тест. Достоверные результаты можно получить только при строгом соблюдении инструкции.
2. Контрольные материалы или образцы сыворотки должны быть включены в каждый тест при высоком и низком уровне для получения достоверных результатов.
3. ПРИ использовании воды для разведения или восстановления влагосодержания используйте дистиллированную или неионизированную.
4. Для того чтобы сократить подвержение, какому либо воздействию вредных веществ, нужно носить перчатки при использовании реагентов теста и человеческих образцов.
5. Все составляющие теста и человеческие образцы нужно привести к комнатной температуре и осторожно перемешать, но только перед использованием. Избегайте повторных размораживаний и замораживаний составляющих теста и образцов.
6. Для каждого анализа нужно рисовать кривую калибрации.
7. Контроль следует проводить каждый раз при проведении анализа и на заключающем этапе принимая во внимание установленные доверительные пределы.
8. На неправильные процедурные технические приборы, неточное пипетирование, плохо проведенное промывание, как и неправильное хранение реагентов может указывать то, что значения анализа для контроля не отображают установленные границы.
9. При считывании результатов с микропланшета, присутствие пузырьков воздуха в лунках повлияет на значение оптической плотности (ОП). Перед считыванием осторожно удалите пузырьки.
10. Раствор субстрата (ТМВ) чувствительный к свету и при должном хранении остается бесцветным. На нестабильность и загрязнение указывает голубой цвет раствора. В таком случае его нельзя использовать.
11. ПРИ распределении субстрата и стоп-раствора, не используйте пипетки, в которых эти жидкости могут контактировать с какими-либо металлическими частями.
12. Чтобы избежать загрязнения реагентов, для каждого из них следует использовать новые наконечники для пипеток.
13. НЕ смешивайте различные лотовые номера составляющих теста и не используйте реагенты, срок годности (на этикетках) которых уже вышел.
14. С реагентами комплекта следует обращаться как с потенциально опасными и проводить их утилизацию согласно местному законодательству.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты набора калибруются для прямого определения альдостерона в человеческой сыворотке и моче. Набор не предназначен для определения альдостерона в слюне, плазме или каких-либо других образцах человеческого или животного происхождения.
2. НЕ использовать сильно гемолизированную, липемическую, иктерическую или неправильно собранную сыворотку.
3. Какие-либо образцы или контрольная сыворотка, которые содержат азид или тимерозал не сочетаемые с этим набором, поскольку они могут привести к неправильным результатам.
4. Для разбавления каких-либо образцов с высоким содержанием сыворотки можно использовать только Калибратор 0. Для разбавления каких-либо образцов с высоким содержанием мочи можно использовать только разбавитель мочи. Использование каких-либо других реагентов может привести к получению неправильных результатов.
5. Результаты, полученные при использовании этого теста нельзя принимать как единственную базу для определения клинического диагноза. Например, присутствие гетерофильных антител в пациентах, которые часто принимали пищу животного происхождения, может влиять на результаты в иммунологических тестах. Следовательно, клинический диагноз должен базироваться

на всех аспектах истории болезни пациента, включая частоту использования пищи животного происхождения в случаях получения неправильных результатов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциально биологически опасный материал

Человеческая сыворотка, которая может использоваться для приготовления стандартов и контролей, была протестирована на наличие гепатита В, HCV и антител к HIV: реакции негативны. Тем не менее, поскольку не существует метода, который бы полностью гарантировал отсутствие выше указанных вирусов, необходимо соблюдать осторожность при работе с ними, считая потенциально заразными.

Химическая опасность

Избегайте контакта с реагентами, которые содержат TMB, перекись водорода и серная кислота. При контакте с какими-либо с этих реагентов промойте большим количеством воды. TMB считается карцерогенным веществом.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сыворотка: на одно определение в дублях требуется приблизительно 0,2 мл сыворотки. Отобрать 4-5 мл крови в помеченную пробирку и дать свернуться. Отцентрифугировать и осторожно отделить слой сыворотки. Хранить при 4°C до 24 часов или при -10°C или ниже если анализ запланирован на более позднюю дату.

Моча: на одно определение в дублях требуется приблизительно 1 мл мочи. Собрать мочу, выделенную за 24 часа в контейнер для забора образцов. Хранить при 4°C до 24 часов или при -10°C или ниже если анализ запланирован на более позднюю дату. Все человеческие образцы должны считаться потенциально опасными и обращаться необходимо с соблюдением всех надлежащих мер предосторожности.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Не предусмотрена.

ПОДГОТОВКА МОЧИ

1. Пометить 1 стеклянную или полипропиленовую пробирку для каждого образца мочи.
2. Внести по 1 мл образца мочи в соответствующую пробирку.
*Если образец мутный, сначала отцентрифугировать мочу и работать с супернатантом.
3. Гидролиз: Добавить по 0,1 мл 3,2 N HCl (не поставляется) в каждую пробирку. Осторожно накрыть и подогреть в течение 1 часа при температуре 60° C в темном месте
*3,2 N HCl может быть приготовлен путем добавления 1 мл концентрированной HCl (12N) к 2,75 мл дистиллированной воды.
4. Нейтрализация: Добавить 0,1 мл 3,2 N NaOH в каждую пробирку, аккуратно и тщательно перемешать.
*3,2 N NaOH может быть приготовлен путем растворения 1,28 грамма гранул NaOH в 10 мл дистиллированной воде.
5. Разбавление: Развести 1:50 калибратором А нейтрализованные образцы.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Прецизионные пипетки на 50, 100, 150 и 300 мкл.
2. Одноразовые наконечники для пипеток.
3. Дистиллированная или деионизированная вода.
4. 3,2 N HCl и 3,2 N NaOH (для анализа мочи).
5. Стеклянные или полипропиленовые пробирки (для анализа мочи).
6. Водяная баня (для анализа мочи).
7. Планшетный встряхиватель (шейкер).
8. Микропланшетный считыватель с набором фильтров на 450nm и верхним пределом ОП = 3.0 или более* (см. процедуру анализа, пункт 10).

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. Микротитровальные лунки, покрытые кроличьими антителами к альдостерону - готовые к использованию. Одна 96-луночная (12x8) планшета (делимая до 1 лунки).
Хранение: при 2-8°C
Стабильность: 12 месяцев согласно информации на этикетке.

2. Альдостерон-биотин: концентрат конъюгата авидин-пероксидазы хрена (HRP) – X50

Содержание – конъюгаты альдостерон-биотина и авидин-HRP в буфере на основании протеина с нертутным консервантом.
Объем: 300 мкл/флакон
Хранение: охлажденным до 2-8°C
Стабильность: 12 месяцев или согласно информации на этикетке.
Подготовка: Развести 1 к 50 буферным раствором перед использованием. Если используется вся планшета, необходимо развести 240 мкл HRP в 12 мл буферного раствора.
От остатков обязательно избавиться.

3. Калибраторы альдостерона – готовы к использованию.

Содержимое: 6 флаконов, содержащих альдостерон в буферном растворе на основе человеческой сыворотки с нертутным консервантом. Изготавливается добавлением определенного количества альдостерона в сыворотку.

*ниже приведены приближенные концентрации, точные концентрации см. на этикетках флаконов

Калибратор	Концентрация	Объем/флакон
Калибратор А	0 пг/мл	2,0 мл
Калибратор В	20 пг/мл	0,5 мл
Калибратор С	80 пг/мл	0,5 мл
Калибратор D	300 пг/мл	0,5 мл
Калибратор E	800 пг/мл	0,5 мл
Калибратор F	2000 пг/мл	0,5 мл

Хранение: охладить до 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев в невскрытых флаконах согласно указаниям на этикетке. Открытые стандарты хранятся 14 дней или делятся на аликвоты и замораживаются. Не замораживать и размораживать повторно.

4. Контроль – готов к использованию.

Содержимое: один флакон с альдостероном в буферном растворе на основе человеческой сыворотки с нертутным консервантом. Изготавливается посредством добавления определенного количества альдостерона в буферный раствор. Нормальные значения и приемлемый диапазон указаны на этикетке.
Объем: 0,5 мл/флакон.
Хранение: охладить до 2-8°C
Стабильность: 12 месяцев в невскрытых флаконах или согласно указаниям на этикетке. Открытые контроли хранятся 14 дней или делятся на аликвоты и замораживаются. Не замораживать и размораживать повторно.

5. Концентрат промывочного раствора - X10

Один флакон с раствором неионного детергента, содержащим нертутный консервант.
Объем: 50 мл/флакон
Хранение: охладить до 2-8°C
Стабильность: 12 месяцев или согласно информации на этикетке.
Приготовление: развести 1:10 в дистиллированной воде перед использованием. Если используется вся планшета, развести 50 мл раствора в 450 мл воды.

6. Рабочий буфер – готов к использованию.

Содержимое: один флакон с буферным раствором на основе белка с нертутным консервантом.
Объем: 15 мл/флакон
Хранение: охладить до 2-8°C
Стабильность: 12 мес. или согласно информации на этикетке.

7. Субстрат ТМБ - готов к использованию.

Содержимое: 1 бутылка, содержащая тетраметилбензидин и перекись водорода в буфере без ДМФ или ДМСО.
Объем: 16 мл/флакон
Хранение: охладить до 2-8°C
Стабильность: 12 мес. или согласно информации на этикетке.

8. Стоп-раствор – готов к использованию.

Содержимое: 1 флакон 1М серной кислоты.

Объем: 6 мл/флакон (1)

Хранение: охладить до 2-8°C

Стабильность: 12 мес. или согласно информации на этикетке.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Предварительная обработка образцов

Сыворотка: не требуется.**Моча:** гидролиз, нейтрализация и разбавление (см. соответствующие указания в Подготовке Мочи).

Все реагенты необходимо довести до комнатной температуры перед использованием. Калибраторы, контроли и образцы необходимо исследовать в дублях. После начала анализа все его этапы должны проходить непрерывно.

1. Приготовьте рабочие растворы конъюгата и промывочного раствора. Разведите образцы мочи, подлежащие анализу.

2. Отобрать необходимое количество микропланшетных лунок. Герметично закрыть упаковку с оставшимися лунками, хранить в холодильнике.

3. Раскапать по 50 мкл каждого калибратора, контроля и образца пациента (сыворотки или подготовленной мочи) в дублях в соответственно помеченные лунки.

4. Раскапать по 100 мкл конъюгата рабочего раствора в каждую лунку (рекомендуется использовать многоканальную пипетку).

5. Инкубировать в планшетном шейкере (прибл. 200 об/мин) 1 час при комнатной температуре.

6. Промыть лунки трижды разведенным рабочим раствором в количестве 300 мкл на 1 лунку и выстучать на абсорбирующую бумагу до полной сухости (рекомендуется использование промывателя).

7. Раскапать по 150 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку с одинаковыми временными интервалами.

8. Инкубировать на планшетном встряхивателе 10-15 минут при комнатной температуре (или до появления темной окраски калибратора А для требеумой ОП).

9. Раскапать по 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку с одинаковыми временными интервалами как в п. 7.

10. Считать результаты на микропланшетном считывателе при 450 нм не позднее чем через 20 минут после добавления стоп-раствора.

* Если оптическая плотность превышает верхний предел определения или нет фильтра на 450 нм, можно использовать фильтр 405 или 415 нм. Оптические плотности будут ниже, но это не повлияет на результаты образцов пациента и контролей.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого дубля калибратора.

2. Изобразить калибровочную кривую на полулогарифмической бумаге со средними оптическими плотностями на оси Y и концентрациями калибраторов на оси X.

Если используется программное обеспечение, рекомендуется 4-параметровая кривая.

3. Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого неизвестного дубликата.

4. Считать значения образцов сыворотки и плазмы непосредственно с калибровочной кривой.

5. Считать значения образцов мочи с полученной кривой и умножить на коэффициент 50. Затем умножить на объем собранной 24-часовой мочи (в мл), чтобы получить значения в пг/24 часа. И наконец, разделите значения пг/24 ч на 1×10^6 , чтобы получить значения в мкг/24 ч.

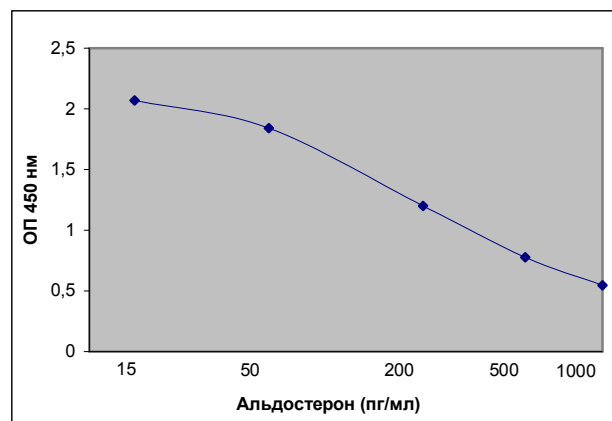
6. Если образец сыворотки или плазмы показывает концентрацию более 1000 пг/мл необходимо развести его калибратором А не более чем 1:8. Полученный результат умножить на коэффициент разбавления. Если образец мочи показывает концентрацию более 1000 пг/мл необходимо развести его разбавителем мочи не более чем 1:2 (от первичного разбавления 1:50). Полученный результат умножить на фактор разбавления.

Типичный пример полученных данных указан в таблице:

Калибратор	ОП 1	ОП 2	средняя ОП	Значение (пг/мл)
A	2,724	2,59	2,647	0
B	2,455	2,499	2,477	20
C	2,115	2,103	2,109	80
D	1,351	1,401	1,376	300
E	0,837	0,810	0,824	800
F	0,528	0,521	0,525	2000
неизвестный	1,885	1,805	1,845	138

Типичная калибровочная кривая

Служит только для примера. **Не использовать** для подсчета результатов.

**ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ - НОРМА**

Как и при всех клинических анализах, каждая лаборатория должна собрать данные и установить свой диапазон ожидаемых значений нормы.

Группа:	Неограниченный прием соли, сидячее положение
Субъекты:	54
Среднее:	105 пг/мл
Ожидаемый диапазон (в основном при 95%)	23-315 пг/мл

РЕФЕРЕНТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ – НОРМА (МОЧА)

Как при всех клинических анализах, каждая лаборатория должна установить свой диапазон ожидаемых значений нормы.

Группа	Диапазон (мкг/24 ч.)
Обычный прием соли	5-19

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Чувствительность**

Минимальный определяемый уровень рассчитывается по стандартной кривой определением концентрации среднего значения ОП калибратора А (по результатам 10 постановок) за вычетом 2 СО. Как результат, чувствительность данного набора равна **15 пг/мл**.

Специфичность (перекрестная реактивность)

Следующие составляющие были протестированы на перекрестную реактивность с набором Aldosterone ELISA, где перекрестная реактивность альдостерона составила 100%.

Стероид	% перекрестной реактивности
Альдостерон	100
11-Диоксикортикостерон	1,1

Следующие стероиды были протестированы, но показали перекрестную реактивность менее 0,001%: Androsterone, Cortisone, 11-Deoxycortisol, 21-Deoxycortisol, Dihydrotestosterone, Estradiol, Estriol, Estrone, Testosterone.

ТОЧНОСТЬ В АНАЛИЗЕ

Три образца были протестированы 10 раз по одной калибровочной кривой. Результаты приведены ниже (в пг/мл):

Образец	Среднее значение	СО	КВ%
1	66,83	5,68	8,5
2	116,94	5,50	4,7
3	202,07	12,93	6,4

ТОЧНОСТЬ МЕЖДУ АНАЛИЗАМИ

Три образца были протестированы 10 раз в течение 4 недель. Результаты (в пг/мл) приведены ниже:

Образец	Среднее значения	СО	КВ%
1	75,65	6,43	8,5
2	114,62	10,09	8,8
3	180,97	15,74	8,7

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ, ЛИНЕЙНОСТЬ

(См. в оригинале инструкции).

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua