

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬДОСТЕРОНА В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ, ПЛАЗМЕ И МОЧЕ

### EIA-4128, Aldosterone ELISA

Каталог. № : EIA-4128

Методика от 29-05-2015

Количество : 96

Версия 9.0

Производитель: DRG (Германия)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

#### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Для прямого количественного определения альдостерона методом иммуноферментного анализа в сыворотке, плазме и моче.

#### 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 ридере. 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.

#### 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 повторной разморозки и заморозки составляющих теста и образцов.
6. Для каждого анализа нужно строить калибровочную кривую.
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 (ТМБ) 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 гемолизованную, липемическую, иктерическую или неправильно собранную сыворотку.
3. Какие-либо образцы или контрольная сыворотка, которые содержат азид или тиомерозал, не сочетаемы с этим набором, поскольку они могут привести к неправильным результатам.
4. Только калибратор А может быть использован для разбавления любых высоких образцов. Только разбавитель для мочи может быть использован для разбавления любых высоких образцов мочи. Использование любых других реагентов может привести к ложным результатам.

#### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

##### **ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

Человеческая сыворотка, которая могла быть использована при подготовке стандартов и контролей, была проверена и найдена не реактивной к поверхностному антигену вируса гепатита В, а также была испытана на наличие антител к ВГС и Вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) и была найдена отрицательной. Однако, ни один тест не может дать полной гарантии, что ВИЧ, ВГС и вирус гепатита В или любой другой инфекционный агент отсутствуют. Реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные и обращаться с ними с теми же мерами предосторожности, которые применяются к любому образцу крови.

##### **ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ**

Избегайте контакта с реагентами, которые содержат ТМБ, перекись водорода и серную кислоту. При контакте с каким-либо из этих реагентов промойте большим количеством воды. ТМБ считается канцерогенным веществом.

#### ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

##### **Сыворотка:**

На одно определение в дублях требуется приблизительно 0.2 мл сыворотки. Собрать 4-5 мл крови в помеченную пробирку и дать свернуться. Центрифугировать и осторожно отделить слой сыворотки.

Хранить при 4 °С до 24 часов или при -10 °С или ниже, если анализ запланирован на более позднюю дату.

##### **Плазма:**

Для одного определения в дублях требуется приблизительно 0.2 мл плазмы. Собрать 4-5 мл крови в пробирки с плазмой ЭДТА.

Хранить при 4 °С до 24 часов или при -10 °С или ниже, если анализ запланирован на более позднюю дату.

##### **Моча:**

На одно определение в дублях требуется приблизительно 0.2 мл мочи. Собрать мочу, выделенную за 24 часа, в контейнер для забора образцов.

Хранить при 4 °С до 24 или при -10 °С или ниже, если анализ запланирован на более позднюю дату.

Рассматривать все человеческие образцы как возможные биологически опасные материалы и принять соответствующие меры предосторожности при обращении.

#### ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

**Сыворотка и плазма:** Это прямой анализ; предварительной обработки образцов не требуется.

**Моча:** Развести образцы мочи 1:50 в растворе для разведения мочи.

Пример: К 1 мл раствора для разведения мочи добавить 20 мкл образца мочи.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ (НЕ ВХОДЯТ В НАБОР):

1. Прецизионные пипетки на 50, 100, 150 и 300 мкл
2. Одноразовые наконечники для пипеток
3. Дистиллированная или неионизированная вода
4. Микропланшетный шейкер
5. Микропланшетный ридер с набором фильтров на 450 нм и верхним пределом ОП = 3.0 или более\* (см. процедуру анализа, пункт 10).

6. Раствор для разведения мочи – требуется при анализе образцов мочи. Используется для разведения образцов мочи перед исследованием. Поставляется в любом количестве.

#### КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

- Микротитровальные лунки, покрытые кроличьими антителами к альдостерону** - готовы к использованию. Один 96- луночный (12x8) планшет (делимый до 1 лунки).  
Хранение: при 2-8 °С  
Стабильность: 12 месяцев или согласно информации на этикетке.
- Концентрат конъюгата альдостерона с пероксидазой хрена (HRP)** – готов к использованию.  
Содержание – конъюгат Альдостерон-HRP в буфере на основании протеина с не ртутным консервантом.  
Объем: 15 мкл/флакон  
Хранение: охлажденным до 2-8 °С  
Стабильность: 12 месяцев или согласно информации на этикетке.
- 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

Стандарт	Концентрация	Объем/флакон
Стандарт А	0 пг/мл	2,0 мл
Стандарт В	15 пг/мл	0,6 мл
Стандарт С	50 пг/мл	0,6 мл
Стандарт D	200 пг/мл	0,6 мл
Стандарт E	500 пг/мл	0,6 мл
Стандарт F	1000 пг/мл	0,6 мл

Хранение: охладить до 2-8 °С

Стабильность: 12 месяцев в невскрытых флаконах согласно указаниям на этикетке. Открытые стандарты хранить 14 дней или разделить на аликвоты и заморозить. Не замораживать и не размораживать повторно.

- Контроли** – готовы к использованию.  
Содержимое: Два флакона 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: 0,6 мл/флакон.  
Хранение: охладить до 2-8 °С  
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 не размораживать повторно.
- Концентрат промывочного раствора** – требует приготовления.  
Один флакон с раствором не ионного детергента, содержащий нертутный консервант.  
Объем: 50 мл/флакон  
Хранение: охладить до 2-8 °С  
Стабильность: 12 месяцев или согласно информации на этикетке.  
Приготовление: развести 1:10 в дистиллированной воде перед использованием.  
Если используется весь планшет, развести 50 мл концентрата промывочного буфера в 450 мл воды.
- Субстрат ТМБ** - готов к использованию.  
Объем: 16 мл/флакон  
Хранение: охладить до 2-8 °С  
Стабильность: 12 месяцев или согласно информации на этикетке.
- Стоп-раствор** – готов к использованию.  
Содержимое: 1М серная кислота.  
Объем: 6 мл/флакон  
Хранение: охладить до 2-8 °С  
Стабильность: 12 месяцев или согласно информации на этикетке.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

##### Предварительная обработка образцов

Сыворотка и плазма: не требуется.

Моча: Развести 1:50 в растворе для разведения образцов мочи.

##### Процедура

Все реагенты необходимо довести до комнатной температуры перед использованием. Стандарты, контроли и образцы необходимо

исследовать в дублях. После начала анализа все его этапы должны проходить непрерывно.

- Приготовить рабочий раствор промывочного буфера. Разбавить образцы мочи, если их будут анализировать.
- Отобрать необходимое количество микропланшетных лунок. Герметично закрыть упаковку с оставшимися лунками, хранить в холодильнике.
- Пипетировать по 50 мкл каждого стандарта, контроля и образца пациента (сыворотки или разведенной мочи) в дублях в соответственно помеченные лунки.
- Пипетировать по 100 мкл раствора конъюгата рабочего раствора в каждую лунку (рекомендуется использовать многоканальную пипетку).
- Инкубировать на планшетном шейкере (прибл. 200 об/мин) 1 час при комнатной температуре.
- Промыть лунки трижды разведенным рабочим раствором в количестве 300 мл на 1 лунку и выстучать на абсорбирующую бумагу до полной сухости (рекомендуется использования вошера).
- Пипетировать по 150 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку с одинаковыми временными интервалами.
- Инкубировать на планшетном шейкере 15-20 минут при комнатной температуре (или до появления синей окраски 0 стандарта).
- Пипетировать по 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку с одинаковыми временными интервалами как в 7 этапе.
- Считать результаты на микропланшетном ридере при 450 нм не позднее, чем через 20 минут после добавления стоп-раствора.

\*Если оптическая плотность превышает верхний предел детекции или нет фильтра 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

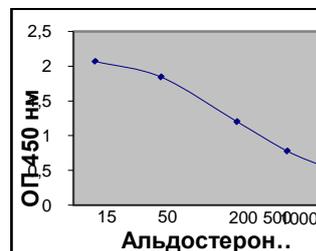
- Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого дубля Стандарта.
- Изобразить калибровочную кривую на полулогарифмической бумаге со средними оптическими плотностями на оси Y и концентрациями Стандартов на оси X. Если используется программное обеспечение, рекомендуется 4-параметровая кривая.
- Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого неизвестного дубликата.
- Считать значения образцов сыворотки и плазмы с полученной кривой.
- Считать значения образцов мочи с полученной кривой и умножить на 50. Затем умножить на объем собранной за 24 часа мочи (в мл) для получения значения в пг/24 часа. Затем разделить значения (пг/24 часа) на  $1 \times 10^6$  для получения значения в мкг/24 часа.
- Если образец сыворотки или плазмы показывает концентрацию более 1000 пг/мл необходимо развести его Стандартом А не более чем 1:8. Полученный результат умножить на фактор разведения.  
Если образец мочи показывает более 1000 пг/мл развести его раствором для разведения мочи не более 1:2 (от исходного соотношения 1:50). Полученный результат умножить на коэффициент разведения.

#### Типичный пример полученных данных:

Стандарт	Средняя ОП	Концентрация (пг/мл)
A	2,278	0
B	2,167	15
C	1,798	50
D	0,950	200
E	0,485	500
F	0,322	1,000
Неизвестный	1,383	103

#### Типичная калибровочная кривая

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



Это только пример кривой. **Не использовать** для вычисления результатов.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Чувствительность

Предел обнаружения был определен из анализа 60 образцов бланка и образцов с низким значением следующим образом:  $LoD = \mu B + 1.645 \sigma B + 1.645 \sigma S$ , где  $\sigma B$  и  $\sigma S$  стандартные отклонения бланка и образца с низким значением, а  $\mu B$  среднее значение бланка. Предел обнаружения составил 14 пг/мл

### Специфичность (перекрестная реактивность)

Следующие компоненты были протестированы на перекрестную реактивность с набором при 100% перекрестной реактивности альдостерона.

Стероид	% Перекрестной реактивности
Альдостерон	100
11-Деоксикортикостерон	1.1

Следующие стероиды были протестированы, но проявили перекрестную реактивность при меньше чем 0.001%: Андростерон, Кортизон, 11-Деоксикортизол, 21-Деоксикортизол, Дигидротестостерон, Эстрадиол, Эстриол, Эстрон и Тестостерон.

### Точность в анализе

Три образца были анализированы 20 раз каждый на одной и той же калибровочной кривой. Результаты (в пг/мл) представлены ниже:

Образец	Среднее Значение	SD	CV %
1	78.6	5.89	7.5
2	204	7.75	3.8
3	386	15.05	3.9

### Точность между анализами

Три образца были анализированы 10 раз каждый на протяжении 4 недель. Результаты (в пг/мл) представлены ниже:

Образец	Среднее Значение	SD	CV %
1	18.36	1.72	9.4
2	128.52	12.5	9.7
3	505.77	48.55	9.6

### Восстановление

Насыщенные образцы приготовили добавлением определенных количеств альдостерона к трем образцам сыворотки пациента. Результаты (в пг/мл) представлены ниже:

Образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Восстановление, %
1 Ненасыщенный	45.30	-	-
	+51.0	96.3	123.7
	+101.90	147.2	97.6
	+203.80	249.1	91.3
2 Ненасыщенный	130.0	-	-
	+51.0	181.0	115.7
	+101.90	231.9	104.8
	+203.80	333.8	92.1
3 Ненасыщенный	208.4	-	-
	+51.0	259.4	111.5
	+101.90	310.3	110.1
	+203.80	412.2	111.6

### Линейность

Два образца сыворотки пациента разводили с Калибратором А. Результаты (в пг/мл) представлены ниже:

Образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Восстановление, %
1	395.1	-	-
	1:2	197.6	100.5
	1:4	98.8	81.7
	1:8	49.5	89.5
2	414.2	-	-
	1:2	207.1	99.8
	1:4	103.6	100.3
	1:8	51.8	109.5

## ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ – СЫВОРОТКА/ПЛАЗМА

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений.

Группа	n	Диапазон (пг/мл)
Нормальное употребление соли, лежащие	120	15-133

## РЕФЕРЕНТНЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ - МОЧА

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений.

Группа	Диапазон (мкг/24 часа)
Нормальное употребление соли,	5-19



## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»