



НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬДОСТЕРОНА МЕТОДОМ ИФА

Тест для количественного определения альдостерона в сыворотке крови человека

Кат.№ CAN-ALD-450N
Производитель: Diagnostics Biochem Canada Inc., (Канада)

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

Методика от 10-2010
Версия 8.0

ВВЕДЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения Альдостерона в сыворотке человека методом иммуноферментного анализа. Для определения Альдостерона в моче необходим гидролиз. Только для использования в исследовательских целях. Не для использования в диагностике.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод основан на иммуноферментном анализе с использованием конкурентного связывания. Немеченый антиген (присутствующий в образцах, контролях и стандартах) и меченый ферментом антиген (конъюгат) во время инкубации конкурируют за ограниченное количество сайтов связывания антител, иммобилизованных в лунках микропланшета. Затем, после промывки, добавляется ферментный субстрат. Энзиматическая реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Абсорбция измеряется с помощью микропланшетного анализатора. Интенсивность окрашивания, сформировавшегося в ходе энзиматической реакции, обратно пропорциональна концентрации альдостерона в образце. Для построения калибровочной кривой используется набор стандартов. Концентрация альдостерона в исследуемых образцах может быть рассчитана непосредственно из калибровочной кривой.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Альдостерон является сильнодействующим минералокортикоидом, который синтезируется и высвобождается под контролем ренин-ангиотензиновой системы организма. Альдостерон активизирует реабсорбцию натрия в дистальных почечных канальцах, что выражается в секреции калия вместе с задержкой натрия, каковая контролирует объем циркулирующей крови. Хроническая сверхпродукция и секреция альдостерона приводит к гипертензии. Измерения уровня альдостерона в сыворотке крови в совокупности с уровнем ренина в плазме могут быть использованы для дифференциальной диагностики первичного и вторичного альдостеронизма.

Условие	Альдостерон в сыворотке	Ренин в плазме
Первичный альдостеронизм	Низкий	Высокий
Вторичный альдостеронизм	Высокий	Высокий

Измерение альдостерона во взаимодействии с тестами избирательной супрессии или стимуляции можно использовать для дальнейшей дифференциации первичного альдостеронизма на два основных типа:

1. Первичный альдостеронизм, вызванный аденомой одного или обоих надпочечников.
2. Первичный альдостеронизм, вызванный гиперплазией надпочечников.

Такая дифференциация очень важна для правильного лечения и контроля заболевания. Аденома надпочечников хорошо поддается хирургическому лечению, в то время как гиперплазия надпочечников обычно хорошо лечится медикаментозными методами. Следовательно, точное и аккуратное измерение альдостерона в сыворотке с помощью иммуноферментного анализа может быть важным вспомогательным инструментом в дифференциальной лабораторной диагностике гипертензионных заболеваний.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для успешного проведения анализа необходимо полное понимание данной инструкции пользователями. Достоверные результаты могут быть получены только при строгом и тщательном соблюдении данной инструкции, предоставляемой с набором.
2. Контрольные материалы или пулы сывороток с высоким и низким значениями должны быть включены в каждую постановку, для оценки достоверности результатов.
3. Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.
4. Для того чтобы избежать контакта с потенциально опасными веществами, необходимо надевать перчатки при работе с реагентами набора и образцами сывороток.
5. Все образцы и реагенты набора должны достичь комнатной температуры и быть аккуратно, тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
6. Калибровочная кривая должна быть включена в каждую постановку.
7. Контроль должен быть включен в каждую постановку. Его значение, полученное при тестировании, должно соответствовать указанному диапазону допустимых значений.
8. Неточное соблюдение процедур, техники анализа, неточное пипетирование, неполные промывки, а также несоблюдение условий хранения реагентов набора может привести к недостоверным результатам, к тому, что результат, полученные для контроля, не попадет в диапазон допустимых значений.
9. Присутствие пузырьков воздуха в лунках микропланшета влияет на результаты при считывании оптической плотности (ОП) с использованием микропланшетного анализатора. Перед считыванием результатов тщательно удалите все пузырьки с поверхности жидкости.
10. Раствор субстрата (ТМВ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным при правильном хранении. Нестабильность или загрязнение реагента могут проявиться в вид окрашивания реагента в голубой цвет. В этом случае реагент использовать нельзя.
11. При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
12. Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
13. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
14. Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения альдостерона в сыворотке или моче человека. Данный набор не предназначен для определения альдостерона в других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Не используйте образцы с сильным гемолизом, липемией, желтухой, или неправильно хранившиеся образцы.
3. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тиомерозал не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
4. Для разведения сывороток или мочи с высокими концентрациями может быть использован только калибратор А. Использование любого другого реагента может привести к ложным результатам.
5. Результаты, полученные с помощью данного набора, никогда не должны использоваться как единственное основание для постановки диагноза. Например, присутствие гетерофильных антител у пациентов, регулярно контактирующих с животными или с материалами животного происхождения, потенциально может влиять на результаты иммунологического анализа. Следовательно, клиническая диагностика должна базироваться на полном обследовании пациента, учитывая, в том числе, интенсивность контактов с животными/продуктами, если можно подозревать ложные результаты.

ПОТЕНЦИАЛЬНО БИООПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Сыворотка человека, которая могла быть использована при приготовлении реагентов, стандартов и контролей, была протестирована с отрицательными результатами на содержание поверхностного антигена гепатита В, антител к ВИЧ и вирусу гепатита С. Однако не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие таких инфекционных агентов как ВИЧ, гепатит В, С и других. Таким образом, реагенты должны рассматриваться как биологически опасные материалы и обращаться с ними необходимо в соответствии с нормами, принятыми в лаборатории для образцов крови.

ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ

Избегайте контактов с реагентами, содержащими TMB, перекись водорода и соляную кислоту. При контакте с такими реагентами тщательно промойте место контакта большим количеством воды. TMB может быть канцерогенным веществом.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сыворотка: Для проведения анализа в дублях необходимо приблизительно 0,2 мл сыворотки. Соберите 4-5 мл крови в соответствующую надписанную пробирку и дайте ей свернуться. Центрифугируйте и аккуратно соберите сыворотку. Храните при 4°C не более 24 часов. Для более длительного хранения необходимо заморозить образец при температуре -10°C или ниже.

Моча: Для проведения анализа в дублях необходимо приблизительно 1 мл мочи. Соберите 24-часовую мочу в специальный контейнер. Храните при 4°C не более 24 часов. Для более длительного хранения необходимо заморозить образец при температуре -10°C или ниже. Считайте все образцы человеческого происхождения потенциально инфекционно опасными и обращайтесь с ними с соответствующими предосторожностями.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

Подготовка образцов не требуется.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ МОЧИ

1. Пометьте по одной стеклянной или полипропиленовой пробирке для каждого образца мочи.
2. Внесите по 1 мл образцов мочи в соответствующие пробирки. *если образец мутный, то предварительно отцентрифугируйте мочу и работайте с супернатантом.
3. Гидролиз: внесите по 0,1 мл 3,2N HCl (не входит в состав набора) в каждую пробирку. Плотно закройте пробирки и нагревайте их в течение 1 часа при 60°C в темноте. *3,2N HCl можно приготовить путем добавления 1 мл концентрированной HCl (12N) к 2,75 мл дистиллированной воды.
4. Нейтрализация: внесите по 0,1 мл 3,2N NaOH в каждую пробирку и аккуратно и тщательно перемешайте. *3,2N NaOH можно приготовить путем растворения 1,28 г гранул NaOH в 10 мл дистиллированной воды.
5. Разведение: разведите нейтрализованные образцы 1:50 с помощью калибратора А.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Дозаторы на 50, 100, 150 и 300 мкл
2. Одноразовые сменные наконечники
3. Деионизированная или дистиллированная вода
4. 3,2N HCl и 3,2N NaOH (для анализа мочи)
5. Стеклянные или полипропиленовые пробирки (для анализа мочи)
6. Водяная баня (для анализа мочи)
7. Микропланшетный шейкер
8. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 450 нм и верхним пределом ОП 3.0 или более* (см. шаг 10 процедуры)

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. Микропланшет, покрытый кроличьими антителами к альдостерону (с «ломаемыми» стрипами) - 96-ячеечный микропланшет (8x12), покрытый поликлональными антителами в закрываемом пакете с осушителем. Готов к использованию.

Хранение: охлажденным при 2 – 8 °С

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

2. Концентрат конъюгата альдостерона-биотина: авидин-пероксидаза хрена (HRP) – требует приготовления.

Содержание: Конъюгаты альдостерон-биотин и авидин-HRP в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 300 мкл во флаконе

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Перед использованием развести концентрат в соотношении 1:50 в рабочем буфере. При использовании всего микропланшета разведите 240 мкл HRP в 12 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

3. Калибраторы альдостерона - готовы к использованию.

Содержание: 6 флаконов, содержащих альдостерон в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлены добавлением известных количеств альдостерона в матрикс.

* В таблице приведены приблизительные концентрации, точные значения указаны на этикетках флаконов.

Калибратор	Концентрация	Объем во флаконе
Калибратор А	0 пг/мл	2 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 Е	800 пг/мл	0.5 мл
Калибратор F	2000 пг/мл	0.5 мл

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: невскрытые флаконы хранятся 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия калибраторы должны быть использованы в течение 14 дней или алиquotированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания

4. Контроли – готовы к использованию.

Содержание: 2 флакона, содержащие альдостерон в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлен с добавлением определенного количества альдостерона в буфер. Ожидаемое значение и допустимый диапазон указаны на этикетке флакона.

Объем: 0.5 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: невскрытый флакон хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия контроль должен быть использован в течение 14 дней или алиquotированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

5. Концентрат промывочного буфера – требует приготовления.

Содержание: 1 флакон, содержащий буфер с неионным детергентом и консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 50 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Развести в соотношении 1:10 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. Если для анализа используется весь микропланшет, разведите 50 мл концентрата промывочного буфера 450 мл воды.

6. Рабочий буфер – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий белковый буфер с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 15 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

7. Субстрат ТМБ – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий тетраметилбензидин и перекись водорода в не-DMF или DMSO содержащем буфере.

Объем: 16 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

8. Стоп-раствор – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий 1М серной кислоты.

Объем: 6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА**Подготовка образцов:***Сыворотка: Нет.**Моча: гидролиз, нейтрализация и разведение (см. подробные инструкции выше).*

Все реагенты должны нагреться до комнатной температуры перед использованием.

Калибраторы, контроли и образцы должны анализироваться в дублях.

Вся процедура анализа должна проводиться непрерывно.

1. Приготовьте рабочие растворы конъюгата и промывочного буфера.

2. Выберите необходимое для анализа число стрипов, неиспользованные стрипы снова верните в пакет с осушителем и запечатайте.

3. Внесите по 50 мкл каждого калибратора, контроля и образца (сыворотка или предварительно обработанная моча) в дублях в соответствующим образом помеченные ячейки.

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

5. Инкубируйте 1 час при комнатной температуре на шейкере (приблизительно 200 об/мин).

6. Промойте ячейки 3 раза, используя по 300 мкл разведенного буфера для промывок на ячейку, а затем поступите микропланшетом по фильтровальной бумаге, убедитесь, что ячейки сухие (рекомендуется использовать автоматическое промывающее устройство).

7. Внесите с одинаковой скоростью по 150 мкл раствора ТМВ субстрата в каждую ячейку.

8. Инкубируйте на шейкере в течение 10 – 15 минут при комнатной температуре (или до тех пор, пока калибратор А не приобретет темно-голубой цвет, для получения желаемой ОП).

9. Внесите по 50 мкл стоп-раствора во все ячейки, в той же последовательности и с той же скоростью, как и в шаге 7.

10. Определите оптическую плотность ячеек с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм в течение 20 минут после внесения стоп-раствора.

* Если ОП превышает верхний предел определения ридера или невозможно использовать фильтр 450 нм, можно проводить измерения при 405 нм или 415 нм. При этом ОП будет ниже, но это не повлияет на конечные результаты анализа.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого калибратора.

2. Постройте калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности калибраторов, а по оси X - их концентрацию. Если возможно, рекомендуется использование

программного обеспечения для построения 4-параметрической калибровочной кривой.

3. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.

4. Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой. Если концентрация аналита в образце сыворотки превышает 2000 пг/мл, образец необходимо развести стандартом А в соотношении не более чем 1:8 и проанализировать еще раз. Полученный результат необходимо умножить на коэффициент разведения.

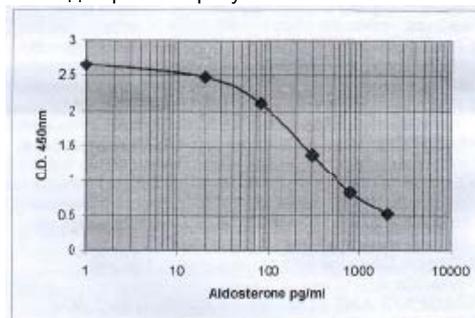
5. Определите значения концентраций аналита в образцах мочи непосредственно из калибровочной кривой и умножьте на фактор разведения 60 (исходные образцы мочи разбавляются в процессе пробоподготовки последовательно 1-в-1,2 и 1-в-50 см выше). Затем умножьте на объем собранной за 24 ч мочи (в литрах). После этого разделите полученную величину на 1000 для того, чтобы получить результат в мкг/24 часа. Если концентрация аналита в образце мочи превышает 2000 пг/мл, образец необходимо развести стандартом А в соотношении не более чем 1:2 (от исходного разведения 1:50) и проанализировать еще раз. Полученный результат необходимо умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, СВЕДЕННЫЕ В ТАБЛИЦУ:

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Значение (пг/мл)
A	2.724	2.569	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

ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Приводится только в демонстрационных целях и не должен использоваться для расчета результатов.

**ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ**

Как и для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений. Ниже приведены ожидаемые значения по результатам исследования нормальных здоровых лиц (пг/мл):

Группа: неограниченное потребление соли, положение сидя
Количество: 54
Среднее: 105 пг/мл
Ожидаемый диапазон (95 перцентиль): 25-315 пг/мл

КОНТРОЛЬНЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ – МОЧА

Как и для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений.

Группа	Интервал (мкг/24 ч)
Нормальное потребление соли	5-19

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Чувствительность:**Нижний предел обнаружения рассчитан исходя из калибровочной кривой вычитанием двух стандартных отклонений из среднего значения ОП нулевого стандарта (стандарт А), измеренного 10 раз. Чувствительность метода dbc Direct Aldosterone ELISA составила **15 пг/мл**.

Специфичность (перекрестная реактивность):

Перечисленные ниже соединения были протестированы на перекрестную реактивность с помощью данного метода, при 100% перекрестной реактивности для альдостерона:

Стероид	Перекрестная реактивность, %
альдостерон	100
11-деоксикортикостерон	1.1

Кроме того, следующие перечисленные соединения были протестированы и перекрестная реактивность составила менее 0.001%: андреностерон, кортизон, 11-деоксикортизол, 21-деоксикортизол, дигидротестостерон, эстрадиол, эстриол, эстрон и тестостерон.

Точность внутри серии:

3 образца были проанализированы 10 раз каждый, по одной калибровочной кривой. Результаты (в пг/мл) приведены ниже:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	66.83	5.68	8.5
2	116.94	5.50	4.7
3	202.07	12.93	6.4

Точность между сериями:

3 образца анализировали 10 раз каждый в течение 2 недель.

Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	75.65	6.43	8.5
2	114.62	10.09	8.8
3	180.97	15.74	8.7

Воспроизводимость

Насыщенные образцы были приготовлены добавлением определенных количеств альдостерона к трем образцам сывороток пациентов. Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1	45.30	-	-
ненасыщенный	119.1	96.3	123.7
+51.0	143.8	147.2	97.6
+101.90	227.5	249.1	91.3
+203.80			
2	130.0	-	-
ненасыщенный	209.4	181.0	115.7
+51.0	243.1	231.9	104.8
+101.90	307.5	333.8	92.1
+203.80			
3	208.4	-	-
ненасыщенный	289.3	259.4	111.5
+51.0	341.6	310.3	110.1
+101.90	460.1	412.2	111.6
+203.80			

Линейность

3 образца сывороток пациентов были разведены калибратором А. Результаты (в пг/мл) приведены в таблице:

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1	859.53	-	-
1:2	456.54	429.77	106.2
1:4	224.16	214.88	104.3
1:8	127.29	107.44	118.5
2	710.39	-	-
1:2	335.07	355.20	94.3
1:4	164.03	177.60	92.4
1:8	88.94	88.80	100.2
3	793.71	-	-
1:2	365.35	396.85	92.1
1:4	160.79	198.43	81.0
1:8	84.56	99.21	85.2

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул. Чорновола, 97,

г. Ивано-Франковск, 76005

тел./факс: (0342)52-57-10

80681043216(безлимит)

E-mail: info@biotechlab-s.com

www.biotechlab-s.com