



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

Кат. № : EIA-4128  
Количество тестов : 96  
Производитель : DRG (США)

Методика от 04-2011  
Версия 7.0

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

Только для диагностики *in vitro*

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

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

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Принцип приведенного ниже анализа основан на простом конкурентном 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.

### КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Альдостерон - это сильнодействующий минеральный кортикоид, освобождение и синтез которого контролируются ренин-гипертензиновой 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	Альдостерон в сыворотке	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:

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

Дифференциация важна для лечения и умения справляться 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 заморозок и размораживаний составляющих теста и образцов.
6. Для каждого анализа нужно рисовать кривую калибровки.
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 сочетаемые с этим набором, поскольку они могут привести к неправильным результатам.
4. Для разбавления каких-либо образцов с высоким содержанием сыворотки можно использовать только Стандарт 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

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 ТМБ, перекись водорода и серная кислота. При контакте с какими-либо с этих реагентов промойте большим количеством воды. ТМБ считается канцерогенным веществом.

#### ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

**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.

**Сыворотка:** на одно определение в дублях требуется приблизительно 0,2 мл сыворотки. Отобрать 4-5 мл крови помеченную пробирку и дать свернуться. Отцентрифугировать 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.

**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.

#### 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):

Прецизионные пипетки на 50, 100, 150 и 300 мкл

1. Одноразовые наконечники для пипеток
2. Дистиллированная или неионизированная вода
3. Микропланшетный шейкер
4. Микропланшетный ридер с набором фильтров на 450нм и верхним пределом ОП = 3.0 или более\* (см. процедуру анализа, пункт 10).
5. Раствор для разведения мочи – требуется при анализе образцов мочи. Используется для разведения образцов мочи перед исследованием. Поставляется в любом количестве.

#### КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

**1. Микротитровальные лунки, покрытые кроличьими антителами к альдостерону** - готовые к использованию. Одна 96-луночная (12x8) планшета (делимая до 1 лунки).

Хранение: при 2-8°С

Стабильность: 12 месяцев согласно информации на этикетке.

**2. Концентрат конъюгата альдостерона с меткой пероксидазы хрена (HRP) – X50**

Содержание – конъюгат Альдостерона-HRP в буфере на основании протеина с не ртутным консервантом.

Объем: 300 мкл/флакон

Хранение: охлажденным до 2-8°С

Стабильность: 12 месяцев или согласно информации на этикетке.

Подготовка: Развести 1:50 буферным раствором перед использованием (нпр. 40 мкл HRP в 2 буферного раствора). Если используется вся планшета, необходимо развести 240 мкл HRP в 12 мл буферного раствора.

От остатков обязательно избавиться.

**3. Стандарты 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/виал
Стандарт 0	0 пг/мл	2,0 мл
Стандарт 1	15 пг/мл	0,6 мл
Стандарт 2	50 пг/мл	0,6 мл
Стандарт 3	200 пг/мл	0,6 мл

Стандарт 4	500 пг/мл	0,6 мл
Стандарт 5	500 пг/мл	0,6 мл

Хранение: охладить до 2-8°С

Стабильность: 12 месяцев в не вскрытых 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.

Содержит: 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°С

Стабильность: 12 месяцев в не вскрытых 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°С

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. Тестовый раствор – готов к использованию.**

один флакон с буферным раствором на основе белка с нертутным консервантом.

Объем: 15 мл/флакон

Хранение: охладить до 2-8°С

Стабильность: 12 мес. или согласно информации на этикетке.

**7. Субстрат ТМБ - готов к использованию.**

Объем: 16 мл/флакон

Хранение: охладить до 2-8°С

Стабильность: 12 мес. или согласно информации на этикетке.

**8. Стоп-раствор – готов к использованию.**

Содержимое: 1М серная кислота.

Объем: 6 мл/флакон (1)

Хранение: охладить до 2-8°С

Стабильность: 12 мес. 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.

1. Приготовьте рабочий раствор конъюгата альдостерона HRP и промывочного раствора. Разбавьте образцы мочи если их будут анализировать.

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

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

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

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

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

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

8. Инкубировать на планшетном шейкере 15-20 минут при комнатной температуре (или до появления синей окраски 0 стандарта).

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

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

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

#### РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

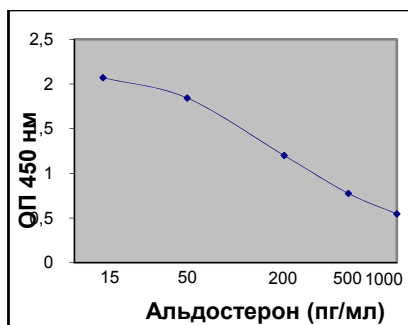
1. Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого дубля Стандарта.
2. Изобразить калибровочную кривую на полулогарифмической бумаге со средними оптическими плотностями на оси Y и концентрациями Стандартов на оси X. Если используется программное обеспечение, рекомендуется 4-параметровая кривая.
3. Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого неизвестного дубликата.
4. Считать значения образцов сыворотки с полученной кривой.
5. 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.
6. Если образец сыворотки 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 занесенных в таблицу:

Стандарт	ОП 1	ОП 2	средняя ОП	Концентрация (пг/мл)
0	2,267	2,197	2,232	0
1	2,102	2,037	2,070	15
2	1,848	1,836	1,842	50
3	1,210	1,190	1,200	200
4	0,763	0,788	0,776	500
5	0,542	0,550	0,549	1000
неизвестный	1,522	1,493	1,508	112

#### Типичная калибровочная кривая

Служит только для примера. Не использовать для подсчета результатов.



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

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Чувствительность

Минимальный определяемый уровень рассчитывается по стандартной кривой определением концентрации среднего значения ОП Стандарта А (по результатам 10 постановок) за вычетом 2 СО. Чувствительность «прямого» набора альдостерона равна **10.0 пг/мл**.

##### СПЕЦИФИЧНОСТЬ (ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ)

Следующие компоненты были протестированы на кросс-реактивность с «прямым» набором Aldosterone ELISA, где кросс-реакция альдостерона составила 100%.  
(См. в оригинале инструкции).

#### 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	18,79	1,96	10,4
2	128,67	5,26	4,1
3	507,22	27,44	5,4

#### Точность между анализами (внешний контроль)

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

Образец	Среднее значения	СО	КВ%
1	18,36	1,72	9,4
2	128,52	12,50	9,7
3	505,77	48,55	9,6

#### Воспроизводимость

Образцы были приготовлены добавлением определенного кол-ва альдостерона в три образца пациента (сыворотки). Результаты (в пг/мл) приведены ниже:

Образец	Факт. рез-т	Ожид. рез-т	Воспроизводимость%
1(ненасыщ.)	45,30	-	-
	+51,0	96,3	123,7
	+101,90	147,2	97,6
	+203,80	249,1	91,3
2(ненасыщ.)	130,0	-	-
	+51,0	181,0	115,7
	+101,90	231,9	104,8
	+203,80	333,8	92,1
2(ненасыщ.)	208,4	-	-
	+51,0	259,4	111,5
	+101,90	310,3	110,1
	+203,80	412,2	111,6

#### Линейность

Два образца пациента были разведены Стандартом А. Результаты (в пг/мл) приведены ниже:

Образец	Факт. рез-т	Ожид. рез-т	Воспроизводимость%
1	395,1	-	-
1:2	198,6	197,6	100,5
1:4	80,7	98,8	81,7
1:8	44,2	49,5	89,5
2	414,2	-	-
1:2	206,7	207,1	99,8
1:4	103,9	103,6	100,3
1:8	56,7	51,8	109,5

#### Ожидаемые нормальные значения – сыворотка

Для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна установить свой диапазон нормальных значений.

Группа	Диапазон (пг/мл)
Обычный прием соли, стоя	40-310
Обычный прием соли, лежа	10-160

#### Референтные значения нормы – моча

Как и при всех клинических анализах, каждая лаборатория должна установить свой диапазон нормальных значений.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»  
ООО «БиоТехЛаб-С»  
ул. Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 612  
e-mail: [www.diameb.ua](mailto:www.diameb.ua)  
[www.biotechlab.com.ua](http://www.biotechlab.com.ua)