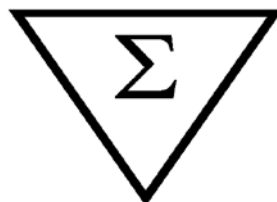


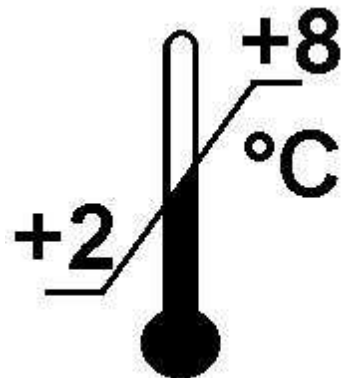
Instructions for use

Инструкция по применению альдостерон ELISA

REF MS E-5200



96



ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Для прямого количественного определения альдостерона в сыворотке, плазме и моче фермента. Иммуноферментный анализ.

Только для диагностики в лабораторных условиях.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип следующего иммуноферментного анализа следует типичному сценарию конкурентного связывания. Конкуренция происходит между немеченым антигеном (присутствует в стандартах, контролях и образцах пациентов в наборе) и фермент-меченым антигеном (конъюгатом) для ограниченного числа антител связывания на планшете. Промывочные и фильтровальные процедуры удаляют несвязанные материалы. После шага промывки добавляется субстрат фермента. Ферментативную реакцию останавливали добавлением стоп-раствора. Оптическую плотность измеряют на ридере микропланшетов. Интенсивность образовавшегося цвета обратно пропорциональна концентрации альдостерона в образце. Набор стандартов используется для построения стандартной кривой, из которой количество альдостерона в образцах пациента и контролях могут быть непосредственно считаны.

Клиническое применение

Альдостерон является мощным минеральным кортикоидом, синтез и высвобождение контролируются ренин-ангиотензиновой системой организма. Альдостерон способствует реабсорбции натрия в дистальных канальцах почек, что приводит к секреции калия наряду с задержкой натрия, который контролирует объем циркулирующей крови.

Хроническое перепроизводство и секреция альдостерона приводит к гипертонии.

Измерение уровней альдостерона в сыворотке в сочетании с уровнем ренина в плазме могут быть использованы для дифференциации между первичным и вторичным альдостеронизмом.

Состояние	Сыворотка Альдостерон	Плазма Ренин
Первичный альдостерон	высокий	низкий
Вторичный альдостерон	высокий	высокий

Измерение альдостерона совместно с селективным подавлением и стимуляцией тестов могут быть использованы для дополнительного дифференцирования первичного гиперальдостеронизма на два основных типа:

- Первичный альдостеронизм, вызванный аденомой одного или обоих надпочечников.
- Первичный альдостеронизм, вызванный гиперплазией коры надпочечников.

Такая дифференциация имеет жизненно важное значение в лечении и для лечения этой болезни. Аденома надпочечников лучше лечится хирургическим путем, тогда как гиперпластическая болезнь надпочечников, как правило, лучше лечится с помощью медикаментов. В общем, точное измерение сыворотки альдостерона с помощью иммуноферментного анализа может быть важным дополнением для дифференциальной диагностики гипертонической болезни.

Процедурные предостережения и предупреждения

- Пользователи должны иметь глубокое понимание этого протокола для успешного использования этого набора. Надежная производительность будет достигнута только путем строгого и тщательного соблюдения инструкции.
- Материалы контроля или сывороточные бассейны должны быть включены в каждом запуске на высоком и низком уровне для оценки достоверности результатов.
- Когда использование воды определяется для разбавления или восстановления, используют деионизированную или дистиллированную воду.
- Для того, чтобы уменьшить воздействие потенциально вредных веществ, следует надевать перчатки при обращении с комплектом реагентов и человеческими образцами.

- Все реагенты набора и образцы должны быть доведены до комнатной температуры и осторожно, но тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторного замораживания и размораживания реагентов и образцов.
- Стандартная кривая должна быть установлена для каждого прогона.
- Контроли должны быть включены в каждом запуске и падение в пределах установленных лимитов доверия.
- Неправомерные процедурные методы, неточное прокапывание, неполная промывка, также как и неправильное хранение реагентов могут быть указаны, когда значения анализа для контроля не отражают установленные диапазоны.
- При чтении микропланшета, наличие пузырьков в лунках будет влиять на оптические плотности (ОП). Осторожно удалите пузырьки перед выполнением шага чтения.
- Раствор субстрата (ТМВ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным, если он хранится надлежащим образом. Нестабильность или загрязнение может быть обозначено развитием голубого цвета, в этом случае он не должен быть использован.
- При дозировании субстрата и стоп-раствора, не используйте пипеток, в которых эти жидкости придут в контакт с любыми металлическими частями.
- Для предотвращения загрязнения реагентов, используйте новый одноразовый наконечник пипетки для дозирования каждого реагента, пробы, стандарта и контроля.
- Не следует смешивать компоненты набора из различных лотов в тесте и не используют какой-либо компонент набора за пределами срока годности, указанного на этикетке.
- Набор реагентов следует рассматривать как опасные отходы и утилизировать в соответствии с национальными правилами.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Все реагенты в наборе калиброваны для прямого определения альдостерона в сыворотке крови человека, плазме и моче. Комплект не откалиброван для определения альдостерона в слюне или других образцах человеческого или животного происхождения.
- Не используйте сильно гемолизированные, липемические, желтушные или неправильно хранившиеся сыворотку или плазму.
- Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид или тимеросал не совместимы с этим набором, так как они могут привести к ложным результатам. · Только стандарт А может быть использован для разбавления каких-либо высоких образцов. Только разбавитель мочи может быть использован для разбавления любых высоких проб мочи. Использование любых других реагентов может привести к ложным результатам. · Результаты, полученные с помощью этого комплекта никогда не должны использоваться в качестве единственной основы для клинического диагноза. Например, возникновение гетерофильных антител у пациентов, регулярно подвергающихся воздействию животных или продуктов животного происхождения имеет потенциал, вызывая помехи в иммунологических тестах. Следовательно, клинический диагноз должен включать в себя все аспекты фона пациента, включая частоту воздействия животных / продуктов, если ложные результаты подозреваются.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ О БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ОПАСНОСТИ МАТЕРИАЛОВ

Сыворотка крови человека, которая может быть использована при подготовке стандартов и контроля было проверена и признана не реакционноспособной для поверхностного антигена вируса гепатита В, а также была протестирована на наличие антител к HCV и вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) и результаты оказались отрицательными. Однако ни один метод тестирования не может гарантировать полностью, что ВИЧ, гепатит С и вирус гепатита В или какие-либо инфекционные агенты отсутствуют. Реагенты следует рассматривать как потенциальную биологическую опасность и обращаться с теми же мерами предосторожности, что применительно к любому контакту с образцом крови.

ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ

Избегайте контакта с реагентами, содержащими ТМВ, перекисью водорода и серной кислотой. Если состоялся контакт с любым из этих реагентов, промыть большим количеством воды. ТМВ является подозреваемым канцерогеном.

ЗАБОР ОБРАЗЦОВ И ХРАНЕНИЕ

Сыворотка : Приблизительно 0,2 мл сыворотки требуется для определения в дублях. Отобрать 4-5 мл крови в надлежащим образом помеченную пробирку и дать свернуться. Центрифугировать и тщательно удалить слой сыворотки. Хранить при 4°C до 24 часов или при -10°C или ниже, если анализы должны быть сделаны более поздней датой.

Плазма: Приблизительно 0,2 мл плазмы требуется для определения в дублях . Отобрать 4-5 мл в EDTA плазмы крови пробирки. Хранить при температуре 4 ° C в течение 24 часов или при -10°C или ниже, если анализы должны быть сделаны более поздней датой.

Моча: Приблизительно 0,2 мл мочи требуется для определения в дублях. Соберите 24-часовую мочу в контейнер для сбора образцов. Хранить при температуре 4 ° C в течение 24 часов или при -10°C или ниже если анализ на будет сделан более поздней датой. Рассматривайте все человеческие образцы как потенциально опасные биологические материалы и принимайте соответствующие меры предосторожности при обращении.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА

Сыворотка и плазма: Этот анализ является прямой системой ; никакая предварительная обработка образцов не является необходимой.

Моча: развести образцы мочи 1:50 в моче разбавителя перед тем , как использовать образец. Пример: к 1 мл разбавителя мочи добавить 20 мкл образца мочи.

РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ НЕОБХОДИМОЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМОЕ ----

- *Высокоточные пипетки для выдачи 50, 100, 150 и 300 мкл ·
 - * одноразовые наконечники пипеток ·
 - * Дистиллированная или деионизированная вода
 - * шейкер
 - * микропланшетный ридер с фильтром на 450нм и верхним пределом ОП 3.0 или более * (см процедура анализа шаг 10)
 - * Разбавитель мочи - требуется, если образцы мочи должны быть проанализированы.
- Используется для разведения образцов мочи перед анализом. Заказывается отдельно (MS E-5241; 20 мл)

РЕАГЕНТЫ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ

A E-0030 Wash Buffer концентрат - X10

Содержит : Один флакон, содержащий буфер с неионогенным детергентом и инертным консервантом.

Объем: 50 мл / флакон

Хранение: охладить до 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или, как указано на этикетке.

Подготовка: развести 1:10 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. Если вся пластина должна быть использована разведите 50 мл промывочного буфера концентрата в 450 мл воды.

AA E-0055 ТМВ субстрат - готов к использованию

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

Хранение: Охладить в 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или, как указано на этикетке.

AA E-0080 Стоп-раствор Готов к использованию.

Содержит: один флакон, содержащий 1М серную кислоту.

Объем: 6 мл / флакон

Хранение: Охладить в 2-8оС

Стабильность: 12 месяцев или, как указано на этикетке.

Стандарты и контроли. Готовы к использованию. Приведены ниже приблизительные концентрации, пожалуйста, обратитесь к этикеткам флаконов для точных концентраций

Кат №	обозначение	Стандарт	Концентрация	Объем/флакон
MS E-5201	STANDARD A	Стандарт А (0)	0 пг/мл	2.0 мл
MS E-5202	STANDARD B	Стандарт В (1)	15 пг/мл	0,6 мл
MS E-5203	STANDARD C	Стандарт С (2)	50 пг /мл	0,6 мл
MS E-5204	STANDARD D	Стандарт Д (3)	200 пг/мл	0,6 мл
MS E-5205	STANDARD E	Стандарт Е (4)	500 пг/мл	0,6 мл
MS E-5206	STANDARD F	Стандарт F (5)	1000 пг/мл	0,6 мл
MS E-5251	CONTROL 1	Контроль 1	См. этикетки флакона для ожидаемого объема и приемлемого диапазона	0,6 мл
MS E-5252	CONTROL 2	Контроль 2		0,6 мл

Содержит : Альдостерон в сыворотке крови человека на основе буфера с нертутным консервантом. Приготовлен пикированием сыворотки с определенным количеством альдостерона.

Хранение: Охладить в 2-8оС

Стабильность: 12 месяцев в закрытых флаконах или, как указано на этикетке. После открытия, стандарты должны использоваться в течение 14 дней или раздроблены и храниться в замороженном виде. Избегайте многократных циклов замораживания и оттаивания.

MS E-5231 Микропланшет разборный, покрытый кролика анти-альдостерона антителами

Содержит : Один 96 луночный (12x8) поликлональными антителами покрытый планшет в многоразовой сумке с осушителем.

Хранение: при 2-8оС

Стабильность: 12 месяцев или, как указано на этикетке.

MS E-5240 альдостерон-пероксидаза хрена (HRP) конъюгат - готов к использованию

Содержание: Альдостерон-HRP конъюгат в основе белка буфером с нертутным консервантом.

Объем: 15 мл / флакон

Хранение: при 2-8оС

Стабильность: 12 месяцев или, как указано на этикетке.

ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Предварительная обработка образцов: Сыворотка и плазма: Нет

Все реагенты необходимо довести до комнатной температуры перед использованием.

Стандарты, контроли и образцы должны быть проанализированы в дубликатах. После начала процедуры, все этапы должны быть завершены без перерыва.

Развести образцы мочи 1:50 с мочой разбавителем перед употреблением.

1. Подготовка рабочего раствора промывочного буфера. Развести любые образцы мочи, если они должны быть проанализированы.

2. Отделите необходимое количество микроstriпов. Запечатайте пакет и верните неиспользованные полоски в холодильник.

3. Внесите 50 мкл каждого стандарта, контроля и образца (сыворотки или разведенной мочи) в соответствующие лунки в двух экземплярах.

4. Внесите 100 мкл альдостерона-HRP конъюгата в каждую лунку.
(мы рекомендуем использовать многоканальную пипетку).
5. Инкубировать на планшетном шейкере (приблизительно 200 оборотов в минуту) в течение 1 часа при комнатной температуре.
6. Промойте лунки 3 раза приготовленной буфером для промывки (300 мкл / лунка для каждой промывки) и выстучать против впитывающей бумаги, чтобы убедиться, что она сухая (использование вошера рекомендуется).
7. Внесите 150 мкл ТМВ субстрата в каждую лунку через определенные промежутки времени.
8. Инкубируйте планшет на шейкере при комнатной температуре в течение 15-20 минут.
(Или пока стандарт А не достигнет темно-синий цвет для желаемой ОП).
9. Прокапайте 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку с теми же определенными промежутками времени, как и в шаге 7.
10. Прочитайте пластину микропланшета на ридере планшетов при длине волны 450 нм в течение 20 минут после добавления стоп-раствора. Если ОП превышает верхний предел обнаружения или если 450нм фильтр недоступен, 405 или 415нм фильтр могут быть замещены. Оптические плотности будут ниже, однако, это не повлияет на результаты пациента / контрольные образцы.

РАССЧЕТ

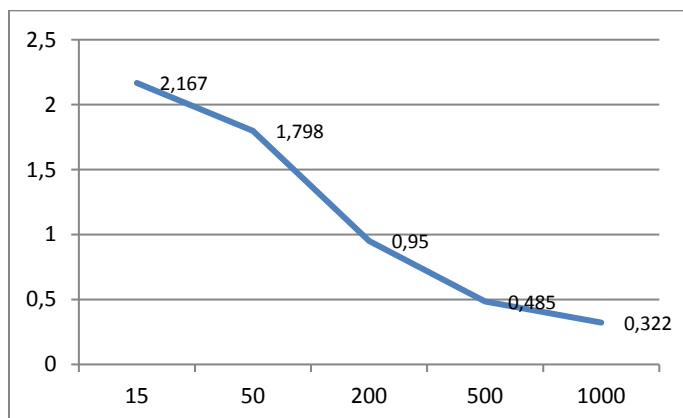
- * Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого стандарта дубликата.
- * Нарисуйте стандартную кривую на полулогарифмической бумаге со средними оптическими плотностями на оси ординат, и стандарт концентрации на оси абсцисс. Если используется программное обеспечение иммуноанализа, 4-параметрическая кривая рекомендуется.
- * Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого неизвестного дубликата.
- * Считать значения сыворотки и плазмы образцов непосредственно со стандартной кривой.
- * Считать значения образцов мочи с полученной кривой и умножить на коэффициент 50. Далее, умножить объем собранной 24-часовой мочи (в мл), чтобы получить значения в пг / 24 часа. И, наконец, разделить пг / 24 часа значения по 1×10^{-6} для получения значения в мкг / 24 часа.
- * Если образцы сыворотки или плазмы читают более 1000 пг / мл, затем разбавить его со стандартом А при разведении не более чем 1: 8. Полученный результат следует умножить на коэффициент разбавления. Если образец мочи показывает более 1000 пг / мл, затем разбавить его с растворителем мочи при разведении не более 1: 2 (из оригинального разведения 1:50). Полученный результат следует умножить на коэффициент разбавления.

ТИПИЧНАЯ таблица данных

Калибратор	Средняя ОП	Значение (пг/мл)
А	2,278	0
В	2,167	15
С	1,798	50
Д	0,950	200
Е	0,485	500
F	0,322	1000
неизвестный	1,383	103

Типичная стандартная кривая

Только пример кривой . Не следует использовать для расчета результатов.



ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Предел обнаружения (Предел ОП) определяли из анализа 60 образцов заготовки и низкого значения образца и он был рассчитан следующим образом:

Предел ОП = $m\bar{b} + 1.645\sigma_B + 1.645\sigma_S$, где σ_B и σ_S являются стандартными отклонениями заготовки и низкого значения образца и $m\bar{b}$ среднее значение заготовки.

Предел обнаружения (Предел ОП) был определен, что 14 пг / мл.

Специфичность (перекрестная реактивность)

Следующие соединения были протестированы на перекрестную реактивность с набором прямого альдостерона ELISA с альдостероно перекрестно реагирующими на все 100%.

Стероид	% перекрестной реактивности
Альдостерон	100
11- деоксикортикостерон	1.1

Следующие стероиды были протестированы, но кросс-реакцию проводили при менее 0,001%: андростерон, кортизон, 11-дезоксикортизол, 21-дезоксикортизол, дигидротестостерон, эстрадиол, эстриол, эстрон и Тестостерон.

INTRA-точность анализа

Три образца анализировали десять раз каждый по той же стандартной кривой. Результаты (в пг / мл) приведены ниже:

Образец	значение	SD	CV%
1	78,6	5,89	7,5
2	204	7,75	3,8
3	386	15,05	3,9

INTER-точность анализа

Образец	значение	SD	CV%
1	18,36	1.72	9,4
2	128,52	12.50	9,7
3	505,77	48,55	9,6

ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Пиковые образцы были приготовлены путем добавления определенных количеств альдостерона к трем образцам сыворотки пациентов.

Результаты (в пг / мл) приведены ниже:

Образец	Наблюдаемый результат	Ожидаемый результат	Восстановление %
1 непииковый	45,30	-	-
+51,0	119,1	96,3	123,7
+101,90	143,8	147,2	97,6
+203,80	227,5	249,1	91,3
2 непииковый	130,0	-	-
+51,0	209,4	181,0	115,7
+101,90	243,1	231,9	104,8
+203,80	307,5	333,8	92,1
3 непииковый	208,4	-	-
+51,0	289,3	259,4	111,5
+101,90	341,6	310,3	110,1
+203,80	460,1	412,2	111,6

ЛИНЕЙНОСТЬ

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

Образец	Наблюдаемый результат	Ожидаемый результат	Восстановление %
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 / Плазма

Что же касается всех клинических анализов, каждая лаборатория должна собрать данные и создать свой собственный диапазон нормальных значений.

Группа	Кол-во	Диапазон (пг/мл)
Нормальное потребление соли, лежачий	120	15-133

СПРАВКА

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

Wilson, J.D. and Foster, D.W. Williams Textbook of Endocrinology 8th Edition. W.B. Saunders Company, London. p 582, 1992.

ЛИТЕРАТУРА

- Varsano-Aharon, N., and Ulick, S., Further Simplifications in the Immunoassay of Plasma Aldosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39/2:375-379, 1974.
- Himathongkam, T., et al., Potassium-Aldosterone-Renin Interrelationships. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41/1:153-159, 1975.
- Lun, S., et al., A Direct Radioimmunoassay for Aldosterone in Plasma. Clin. Chem. 29/2:268-271, 1983.
- Cartledge, S. and Lawson, N., Aldosterone and Renin Measurements. Ann. Clin. Biochem. 37:262-278, 2000.
- Sequeira, S.J., et al., Evaluation of an Aldosterone Radioimmunoassay: The Renin-Angiotensin-Aldosterone Axis as a Function of Sex and Age. Ann. Clin. Biochem. 23:65-75, 1986.
- Stabler, T.V. and Siegel, A.L., Chemiluminescence Immunoassay of Aldosterone in Serum. Clin. Chem. 37/11:1987-1989, 1991.
- Miller, M.A., et al., Extraction Method and Nonextracted Kit Comparison for Measuring Plasma

Aldosterone. Clin. Chem. 43/10:1995-1997, 1997.

• Vallotton M.B., Primary Aldosteronism. Part 1. Diagnosis of Primary Hyperaldosteronism. Clin. Endocrinol.

45: 47-52, 1996.

• Oelkers, W., et al., Diagnosis, Therapy Surveillance in Addison's Disease: Rapid Adrenocorticotrophin (ACTH) Test and Measurement of Plasma ACTH, Renin Activity and Aldosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab.

75:259- 264, 1992

• Ad Dujaili, E.A.S, and Edwards, C.R.W., Optimization of a Direct Radioimmunoassay for Plasma Aldosterone. J. Steroid Biochem. 14:481- 487, 1981.

• Corry, D.B, and Tuck, M.L., Secondary Aldosteronism. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 24:511-528, 1995.

• Check, J.H., et al, Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol. Obstet. Invest. 40:139-140, 1995.

Условные обозначения:

 Температура хранения	 Производитель	 Содержит достаточно для <N> испытаний
 Дата окончания срока действия	LOT Код партии	IVD Только для диагностики в лабораторных условиях!
 Обратитесь к инструкции по пользованию	CONT Содержание	CE Маркировка