LDN®
IMMUNOASSAYS AND SERVICES
BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY
LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Інструкція із застосування

Альдостерон ІФА

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com.
www.novamedline.com

MS E-5200

REF 2°C 8°C Σ 96 IVD CE

1. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Альдостерон ІФА - це ручний імуноферментний аналіз для кількісного вимірювання альдостерону в сироватці або плазмі людини (K_2ЕДТА, K_3EDTA, Li-гепарин або цитрат плазми 3,2%) і сечі.

Тільки для діагностики in vitro. Для лабораторного професійного використання.

Набір призначений для використання як допоміжний засіб для діагностики первинного та вторинного альдостеронізму.

Набір не призначений для діагностики аденоми.

2. НАУКОВИЙ ЧИННИЙ ЗВІТ

Стероїдний гормон є потужним мінеральним кортикоїдом, який виробляється клубочковою зоною кори надниркових залоз. Синтез і вивільнення контролюються ренін-ангіотензин-альдостероновою системою (РААС)[1], а також за концентрацією калію в плазмі[2,12], гіпофізарним пептидом АКТГ і кров'яним тиском через чутливі до тиску барорецептори в стінках судин майже всіх великих артерій тіла[3,12]. Альдостерон зв'язується з мінералокортикоїдними рецепторами (MR) і запускає транскрипцію гормоночутливих генів. Як наслідок, альдостерон підвищує артеріальний тиск шляхом реабсорбції натрію та води з дистальних канальців нирки в кров, виділення калію в сечу та збільшення об'єму циркулюючої крові. Хронічне надвиробництво та секреція альдостерону призводить до гіпертонії. Активність альдостерону знижена при хворобі Аддісона і підвищена при синдромі Конна.

Первинний гіперальдостеронізм, який може бути спричинений альдостеронсекретуючою аденомою/карциномою надниркових залоз або гіперплазією кори надниркових залоз, характеризується гіпертензією, що супроводжується підвищенням рівня альдостерону, гіпернатріємією та гіпокаліємією. Вторинний гіперальдостеронізм (наприклад, у відповідь на реноваскулярне захворювання, виснаження солі, навантаження калію, серцеву недостатність з асцитом, вагітність, синдром Барттера) характеризується підвищенням рівня альдостерону та підвищенням активності реніну в плазмі крові.[4,5,8,9,10,11,13].

Хвороба	Сироватковий альдостерон	Ренін плазми
Первинний альдостеронізм	Високий	Низький
Вторинний альдостеронізм	Високий	Високий

Ця диференціація є життєво важливою для лікування та лікування захворювання. Аденоми надниркових залоз добре піддаються хірургічному втручанню, тоді як гіперпластична хвороба надниркових залоз, як правило, краще лікується медикаментозно.[6].

Крім того, фармакологічна модуляція ядерних гормональних рецепторів є загальною стратегією лікування серцево-судинних захворювань.[7]. Таким чином, визначення впливу таких методів лікування на РААС набуває все більшого значення для оцінки безпеки та ефективності нових терапевтичних засобів.

Крім того, у пацієнтів із ожирінням часто спостерігається гіперальдостеронізм із підвищеною чутливістю артеріального тиску (АТ) до солі. Системна RAS та активація альдостерону/MR відіграють ключову роль у розвитку гіпертензії та пошкодженні органів при ожирінні[14].

Таким чином, точне та точне вимірювання сироваткового альдостерону за допомогою імуноферментного аналізу може бути важливим доповненням до діагностичної лабораторної батареї для диференціальної діагностики гіпертонічної хвороби.

3. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Альдостерон ІФА — це твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА), заснований на принципі конкурентного зв'язування.

Лунки мікропланшета покриті моноклональним антитілом (миші), спрямованим на унікальну антигенну ділянку молекули альдостерону.

Під час першої інкубації альдостерон у доданому зразку конкурує з доданим ферментним кон'югатом, яким є альдостерон, кон'югований з пероксидазою хрону, за зв'язування з покритим антитілом.

Після етапу промивання для видалення всіх незв'язаних речовин тверду фазу інкубують із розчином субстрату. Колориметричну реакцію зупиняють додаванням стоп-розчину та вимірюють оптичну густину (ОП) отриманого жовтого продукту. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації аналіту в зразку.

Стандартна крива будується шляхом побудови графіка значень ОГ проти концентрацій стандартів, а концентрації невідомих зразків визначаються за допомогою цієї стандартної кривої.

4. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Цей набір призначений лише для діагностики in vitro. Тільки для професійного лабораторного використання.
- Перед початком аналізу уважно прочитайте інструкцію із застосування. Використовуйте дійсну версію інструкції з використання, що додається до комплекту. Переконайтеся, що все зрозуміло.
- Не змішуйте та не використовуйте компоненти з наборів з різними номерами партій. Рекомендується не міняти місцями лунки різних пластин навіть однієї партії. Набори могли бути доставлені або зберігалися в інших умовах, і характеристики зв'язування пластин можуть дещо відрізнятися.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетках набору.
- Не використовуйте лунки мікропланшета повторно.

- Реагенти інших виробників не можна використовувати разом з реагентами цього тест-набору.
- Усі реагенти в цьому наборі є прозорими рідинами, розчин субстрату прозорий і безбарвний. Зміни в його зовнішньому вигляді можуть вплинути на продуктивність тесту. У такому випадку зверніться до виробника.
- Мікробне забруднення реагентів або зразків може дати хибні результати.
- Перед початком тесту дайте реагентам досягти кімнатної температури (від 20 °C до 26 °C). Температура впливатиме на показники оптичної густини аналізу.
- Промивний буфер може мати злегка жовтий колір, однак це не впливає на продуктивність аналізу.
- Всі зазначені обсяги повинні виконуватися згідно з протоколом. Оптимальні результати тестування можна отримати лише при використанні каліброваних піпеток і пристроїв для зчитування мікропланшетів.
- Використовуйте резервуари лише для окремих реагентів. Особливо це стосується резервуарів субстрату. Використання резервуара для дозування розчину субстрату, який раніше використовувався для розчину кон'югату, може змінити колір розчину. Не переливайте реагенти назад у оригінальні флакони, оскільки це може призвести до забруднення реагентом.

Загальні запобіжні заходи
- Дотримуйтесь інструкцій із забезпечення якості та лабораторної безпеки.
- Ніколи не піпетуйте ротом і уникайте контакту реагентів і зразків зі шкірою та слизовими оболонками.
- Не паліть, не їжте, не пийте та не застосовуйте косметику в місцях, де працюють із зразками або реагентами для набору.
- Одягайте лабораторні халати та одноразові латексні рукавички під час роботи зі зразками та реагентами та, якщо необхідно, захисні окуляри.

Інформація про біологічну небезпеку
- Усі реагенти цього тестового набору, які містять сироватку або плазму крові людини, були протестовані та підтверджені негативними на ВІЛ I/II, HBsAg та HCV за процедурами, схваленими FDA. Однак жоден відомий метод тестування не може забезпечити повну впевненість у відсутності збудника інфекції.
- Пристрій містить матеріал тваринного походження, який сертифіковано вільний від інфекційних або заразних захворювань і шкідливих паразитів.
- Компоненти великої рогатої худоби походять із країн, де не було повідомлень про захворювання губчатою енцефалопатією великої рогатої худоби.
- З усіма матеріалами та зразками людського або тваринного походження слід поводитися так, ніби вони можуть передавати інфекційні захворювання.
- Поводження має здійснюватися відповідно до процедур, визначених відповідними національними інструкціями чи правилами щодо біологічної небезпеки та безпеки. Відходи необхідно утилізувати відповідно до місцевих правил і норм.

Інформація про хімічну небезпеку та класифікацію небезпеки
- Деякі реактиви містять консерванти в недекларованих концентраціях. Тим не менш, у разі потрапляння в очі або на шкіру негайно промийте водою.
- Розчин субстрату містить інгредієнт у недекларованих концентраціях, який викликає серйозне подразнення очей. У разі можливого контакту з очима негайно обережно і ретельно промийте очима або водою. Після контакту зі шкірою промити великою кількістю води. Зняти забруднений одяг і випрати його перед повторним використанням.
- Уникайте контакту зі стоп-розчином, що містить < 5% H_2TAK_4. Це може викликати подразнення шкіри та опіки.
- Хімікати та підготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до національних інструкцій з безпеки або правил.
- Цей продукт не містить речовин, які мають канцерогенні, мутагенні або токсичні для репродукції (CMR) властивості.

Наступні компоненти набору класифікуються як небезпечні: ферментний кон'югат, стандарт A – F, контроль 1 і контроль 2, промивний розчин.

УВАГА	**Застереження про небезпеку:** H317 – Може викликати шкірну алергічну реакцію. EUH071 – Корозійний для дихальних шляхів.
	Попередження: P261 – Уникайте вдихання пилу/диму/газу/туману/пар/аерозолю. P280 – Одягайте захисні рукавички. P333 + P313 – Якщо виникає подразнення шкіри або висипання: зверніться за медичною порадою/допомогою. P362 + P364 – Зняти забруднений одяг і випрати його перед повторним використанням. P501 – Утилізувати вміст/контейнер на затвердженому заводі з утилізації відходів.

Для отримання детальної інформації зверніться до Паспорту безпеки, який можна отримати за запитом безпосередньо від виробника.

5. МАТЕРІАЛИ

5.1 Матеріали, що входять до набору

MS E-5231 Ш 96 **Мікропланшет**– Готовий до використання

Зміст: 12 x 8 лунок (розібрати); Покритий антитілом проти альдостерону (моноклональним).

Стандарти і контролі – ліофілізовані

Кат №.	компонент	Концентрація	Обсяг/ флакон
MS E-5201	**СТАНДАРТ A**	0 пг/мл	1,0 мл
MS E-5202	**СТАНДАРТ Б**	20 пг/мл	1,0 мл
MS E-5203	**СТАНДАРТ C**	80 пг/мл	1,0 мл
MS E-5204	**СТАНДАРТ D**	200 пг/мл	1,0 мл
MS E-5205	**СТАНДАРТ E**	500 пг/мл	1,0 мл
MS E-5206	**СТАНДАРТ F**	1000 пг/мл	1,0 мл
MS E-5251	**КОНТРОЛЬ 1**	Контрольні значення та діапазони можна знайти на етикетці флакона або у звіті про контроль якості.	1,0 мл
MS E-5252	**КОНТРОЛЬ 2**		1,0 мл

Перетворення: 1 пг/мл = 2,77 пмоль/л

Стандарти відкалібровано за таким еталонним матеріалом:
Сертифікований стандартний матеріал Cerilliant A-096

Зміст: Містить 0,0108% CMIT/MIT (3:1).

Див. «Підготовка реагентів»

MS E-5240 CONJUGATE **Ферментний кон'югат**– Готовий до використання

Зміст: Альдостерон, кон'югований з хроном.
Містить 0,0108% CMIT/MIT (3:1).

обсяг: 1 x 14 мл

FR E-0055 СУБСТРАТ **Розчин субстрату**– Готовий до використання

Зміст: Містить 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB).
Тримайте подалі від прямих сонячних променів.

обсяг: 1 x 14 мл

FR E-0080 STOP-SOLN Стоп розчин– Готовий до використання

Зміст: Містить < 5% H_2TAK_4.
Уникайте контакту зі стоп-розчином. Це може спричинити подразнення шкіри та опіки.

обсяг: 1 x 14 мл

FR E-0030 WASH-CONC 40x **Промивний розчин** – 40X

Зміст: концентрат Містить 0,0108% CMIT/MIT (3:1).

обсяг: 1 x 30 мл

Див. «Підготовка реагентів».

1 x Інструкція з використання

1 x Сертифікат аналізу (CoA)

Скорочення:
CMIT: 5-хлор-2-метил-4-ізотіазолін-3-он
MIT: 2-метилізотіазол-3(2H)-он

5.2 Необхідні, але не надані матеріали

- Калібрований пристрій для зчитування мікропланшетів (450 нм, з еталонною довжиною хвилі від 620 нм до 630 нм)
- Калібровані мікропіпетки змінної точності
- Ручне або автоматичне обладнання для промивання лунок мікропланшета
- Вбираючий папір
- Дистильована вода
- Таймер
- Міліметровий папір або програмне забезпечення для зменшення даних
- **Додатково**: Реагенти для визначення альдостерону в сечі (REF MS U-5200)
  Зміст:
  1) ***Вивільняючий реагент***, 1 флакон, 3 мл, готовий до використання. Містить 1 M HCl. Уникайте контакту з Release Reagent. Це може викликати подразнення шкіри.
  2) ***Буфер нейтралізації***, 1 флакон, 3 мл, готовий до використання. Містить трис-буфер, pH 8,5.
  3) ***Буфер для розведення***, 2 флакони по 25 мл, готові до використання. Містить PBS.
- Додатково: пластикові пробірки (наприклад, 0,5–1,5 мл) для попередньої обробки зразків сечі

5.3 Зберігання та стабільність набору

Невідкриті набори та реагенти а також відкриті реагенти повинні зберігатися при температурі від 2 °C до 8 °C.
Мікропланшет слід завжди зберігати в алюмінієвому пакеті, що закривається, і містить осушувач. Не відкривайте пакет, поки він не досягне кімнатної температури. Мікроплашет складається з 12 окремих стріпів. Кожну стрічку можна розділити на 8 окремих лунок.
Невикористані лунки необхідно негайно повернути в алюмінієвий пакет із осушувачем і зберігати знову щільно закритими при температурі від 2 °C до 8 °C.
Після відкриття флакони з реагентами необхідно знову щільно закрити.

	Температура зберігання	**Стабільність**
Невідкриті набори та невідкриті реагенти	від 2 °C до 8 °C	До закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці. Не використовуйте реагенти після цієї дати!
Відкритий набір	від 2 °C до 8 °C	8 тижнів (Для відновлених реагентів зверніться до «4.4 Реагент Підготовка».)

5.4 Приготування реагентів

Перед використанням нагрійте всі реагенти та необхідну кількість стріпів до кімнатної температури (від 20 °C до 26 °C).

Стандарти

Розчиніть ліофілізований вміст кожної стандартної ампули 1,0 мл дистильованої води та дайте постояти щонайменше 10 хвилин при кімнатній температурі. Перед використанням перемішайте кілька разів.

Стабільність після відновлення:	при температурі від 2 °C до 8 °C	8 тижнів
	при -20 °C (в аліквотах)	12 місяців

Контролі

Розчиніть ліофілізований вміст кожної контрольної ампули 1,0 мл дистильованої води та дайте постояти щонайменше 10 хвилин при кімнатній температурі. Перед використанням перемішайте кілька разів.

Стабільність після відновлення:	при температурі від 2 °C до 8 °C	8 тижнів
	при -20 °C (в аліквотах)	12 місяців

Промивний розчин

Додайте дистильовану воду до 40X концентрованого промивного розчину.
Розведіть 30 мл концентрованого промивного розчину 1170 мл дистильованої води до кінцевого об'єму 1200 мл.

Стабільність після розведення:	при температурі від 20 °C до 26 °C	1 тиждень

5.5 Утилізація набору

Утилізація набору та всіх використаних матеріалів/реагентів повинна здійснюватися відповідно до національних норм.
Спеціальна інформація для цього продукту наведена в паспорті безпеки, розділ 13.

5.6 Пошкоджені тестові набори

У разі будь-якого пошкодження тестового набору або компонентів виробник повинен бути проінформований письмово не пізніше ніж через тиждень після отримання набору. Пошкоджені окремі компоненти не можна використовувати для пробного запуску. Вони повинні зберігатися, поки не буде знайдено остаточне рішення. Після цього їх необхідно утилізувати згідно з офіційними правилами.

6. ЗБІР, ЗБЕРІГАННЯ ТА ПІДГОТОВКА ПРОБ

У цьому тесті можна використовувати наступний зразок

матеріалу:

Сироватка або плазма людини(K_2 ЕДТА, K_3 EDTA, гепарин літію або цитрат плазми 3,2%) і сечі.

Зразки, що містять азид натрію, не слід використовувати в аналізі.

Загалом слід уникати використання гемолітичних, жовтяничних або ліпемічних проб. Для отримання додаткової інформації зверніться до розділу «Речовини, що заважають».

6.1 Зразки сироватки або плазми людини

6.1.1 Збір проб

Сироватка: Зберіть кров за допомогою венепункції (наприклад, Sarstedt Monovette для отримання сироватки), дайте їй згорнутися та відокремте сироватку центрифугуванням при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного згортання. Пацієнтам, які отримують антикоагулянтну терапію, може знадобитися збільшення часу згортання крові.

плазма: Цільну кров слід зібрати в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянт (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідним препаратом плазми) і центрифугувати відразу після збору.

Цільну кров не слід заморожувати перед центрифугуванням.

Стабільність цільної крові[18]	при температурі від 20 °C до 26 °C	до 4	днів

6.1.2 Зберігання зразків

Зразки повинні зберігатися щільно закритими перед проведенням аналізу. Якщо зберігати в замороженому вигляді, заморожуйте лише один раз.

Розморожені зразки необхідно кілька разів перевернути перед тестуванням.

Стабільність	при температурі від 2 °C до 8 °C	5 днів
	при -20 °C (в аліквотах)	до 12 місяців

6.1.3 Підготовка зразка

Зразки можна аналізувати без додаткової підготовки.

6.2 Зразки людської сечі

Концентрацію альдостерону також можна визначити за зразками сечі. Однак зразки сечі повинні бути попередньо оброблені перед аналізом. Для цього знадобляться додаткові реагенти, які не входять до цього набору, але їх можна замовити окремо (REF MS U-5200).

6.2.1 Збір та зберігання проб

Спочатку очистіть область статевих органів м'яким дезінфікуючим засобом, щоб запобігти зараженню. Потім зберіть чисту сечу середнього потоку у відповідний стерильний контейнер.

Оскільки секреція альдостерону відбувається за добовим ритмом, рекомендується збирати сечу в спеціальний охолоджений контейнер протягом повного 24-годинного періоду (24-годинна сеча).

Відразу після збору сечу слід центрифугувати протягом 5–10 хвилин (наприклад, при 2000 g), щоб видалити залишки клітин. Використовуйте супернатант для кількісного визначення аналіту.

Супернатант сечі, який зберігається довше (до 7 днів), слід зберігати при 2–8 °C або заморозити при -20 °C.

Розморожену супернатант слід кілька разів перевернути перед тестуванням.

6.2.2 Протокол попередньої обробки зразка сечі

Для попередньої обробки зразків сечі рекомендується використовувати Альдостеронову сечу Додатковий комплект (MS U-5200).

1. Закріпіть потрібну кількість флаконів (наприклад, пластикові пробірки об'ємом 0,5–1,5 мл; не входять до цього набору).
2. Розподіліть 25 мкл сечі за допомогою нових одноразових наконечників у відповідні пробірки.
3. Додайте 25 мкл вивільняючого реагенту у кожну пробірку.
   Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. На цьому етапі важливо забезпечити повне змішування.
4. Інкубуйте протягом ночі при температурі від 2 °C до 8 °C.
5. Додайте 25 мкл нейтралізуючого реагенту в кожну пробірку та ретельно перемішайте.
6. Додайте 400 мкл буфера для розведення в кожну пробірку та ретельно перемішайте (Ця попередня обробка призводить до розведення 1:19. Тому для розрахунку кінцевої концентрації зразка сечі слід враховувати коефіцієнт розведення 19).
7. Перенесіть 100 мкл попередньо оброблених і розведених зразків сечі безпосередньо в лунку мікропланшета та перейдіть до кроку 3 процедури тестування (розділ 7.2).

6.2.3 Зберігання попередньо оброблених зразків сечі

Попередньо оброблені та розведені зразки сечі слід закрити кришкою та зберігати до 7 днів при температурі від 2 °C до 8 °C або заморозити при -20 °C перед аналізом. Зразки слід заморожувати лише один раз при -20 °C перед аналізом. Розморожені зразки слід кілька разів перевернути перед тестуванням.

6.2.4 Розведення зразка сечі

Якщо під час початкового аналізу зразок сечі містить більше, ніж найвищий стандарт, попередньо оброблений і розведений зразок сечі можна додатково розбавити буфером для розведення та повторно проаналізувати, як описано в Процедурі аналізу. Для розрахунку концентрацій цей коефіцієнт розведення також слід брати до уваги.

приклад:

розведення 1:10: 10 мкл попередньо обробленого та розведеного зразка сечі + 90 мкл буфера для розведення (ретельно перемішати)

(кінцевий коефіцієнт розведення = 19 x 10 = 190)

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

7.1 Процедурні примітки

- Усі реагенти та зразки повинні нагрітися до кімнатної температури (від 20 °C до 26 °C) перед використанням.
- Всі реагенти повинні бути змішані без утворення піни.
- Не міняйте кришки флаконів з реагентами, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Використовуйте нові одноразові пластикові наконечники піпеток для кожного стандарту, контролю або зразка, щоб уникнути перенесення.
- Щоб уникнути перехресного забруднення та хибно підвищених результатів, прокапайте зразки пацієнта та акуратно розподіліть кон'югат, не розбризкуючи його на дно лунок.
- Ретельно перемішайте вміст лунок мікропланшета, щоб забезпечити хороші результати тесту.
- Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додайте реагенти відразу після завершення етапів промивання.
- Після того, як тест розпочато, усі кроки повинні бути завершені без перерви та в однаковій послідовності для кожного кроку.
- Ферментативна реакція лінійно пропорційна часу і температурі.
- Оптична щільність є функцією часу інкубації та температури. Дотримуйтеся часу і температури інкубації, як зазначено в розділі «Процедура тесту».
- Перед початком аналізу рекомендується підготувати всі реагенти, зняти ковпачки, закріпити всі необхідні лунки у тримачі тощо. Це забезпечить рівний час для кожного етапу піпетування без перерви.
- **Важливе зауваження щодо процедури прання:**
  Миття є критичним. Неправильно промиті лунки дадуть помилкові результати. На чутливість і точність цього аналізу істотно впливає правильне виконання процедури прання!
- **Перевірте продуктивність за допомогою повністю автоматизованих аналізаторів:**
  Можливе автоматизоване тестування з використанням повністю автоматизованих пристроїв аналізу відкритої системи. Однак комбінацію має підтвердити користувач.

7.2 Процедура тестування

Кожен цикл повинен містити стандартну криву.
Елементи керування служать внутрішніми засобами контролю надійності процедури тестування. Їх необхідно аналізувати під час кожного тесту.
Наведена процедура тестування описує ручну обробку.
Важлива примітка:На точність цього аналізу помітно впливає правильна температура інкубації.

1.	Закріпіть потрібну кількість лунок мікропланшета в тримачі рамки.
2.	Внесіть 100 мкл кожного стандарту, контролю та зразка за допомогою нових одноразових наконечників у відповідні лунки. Для зразків сечі розподіліть 100 мкл попередньо оброблених і розведених зразків сечі (див. розділ 5.2.2 «Протокол попередньої обробки зразків сечі», крок 7).
3.	Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
4.	Додайте 100 мкл ферментного кон'югату в кожну лунку. Ретельно перемішайте протягом 10 секунд. На цьому етапі важливо забезпечити повне змішування.
5.	Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
6.	Промийте лунки наступним чином: Якщо етап промивання виконується вручну: Ретельно струсіть вміст лунок. Промийте лунки 3 рази 300 мкл розведеного промивного розчину на лунку. Якщо використовується автоматична машина для миття планшетів: Промийте лунки 3 рази 300 мкл розведеного промивного розчину на лунку. <u>Завжди в кінці етапу промивання</u> різко постукайте лунками по абсорбуючому паперу, щоб видалити залишкові краплі!
7.	Внесіть 100 мкл розчину субстрату в кожну лунку.
8.	Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
9.	Зупиніть ферментативну реакцію, додавши 50 мкл стоп-розчину в кожну лунку.
10.	Виміряйте оптичну густину (ОГ) розчину в кожній лунці при 450 нм (зчитування) і при 620 нм до 630 нм (віднімання фону, рекомендовано) за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів. Рекомендується зчитувати лунки протягом 10 хвилин після додавання стоп-розчину.

7.3 Розрахунок результатів

1. Концентрацію зразків сироватки/плазми можна зчитати безпосередньо зі стандартної кривої. Для зразків сечі концентрація, зчитана зі стандартної кривої, повинна бути помножена на коефіцієнт розведення 19 (див. розділ 6.2.4).
2. Для повторного визначення необхідно взяти середнє значення двох значень оптичної густини (ОГ) для кожного стандарту, контролю та зразка пацієнта. Якщо два значення суттєво відрізняються одне від одного, виробник рекомендує повторно перевірити зразки.
3. Зразки з концентраціями, що перевищують найвищий стандарт, можна додатково розбавити та повторно проаналізувати, як описано в розділі «Процедура тестування», або повинні бути представлені як > 1000 пг/мл. Для розрахунку концентрацій слід враховувати цей коефіцієнт розведення.
4. <u>Автоматичний метод:</u>
   Результати, наведені в інструкції з використання, були розраховані автоматично за допомогою підгонки логістичної кривої чотирьох параметрів (4PL). (Переважними методами є 4PL Rodbard або 4PL Marquardt.) Інші функції зменшення даних можуть дати дещо інші результати.
5. <u>Ручний спосіб:</u>
   Використовуючи лінійний або напівлогарифмічний міліметровий папір, побудуйте стандартну криву, відклавши (середнє) ОГ, отримане від кожного стандарту, проти його концентрації зі значенням ОГ на вертикальній (Y) осі та концентрацією на горизонтальній (X) осі.
   Визначте відповідну концентрацію зразка за стандартною кривою, використовуючи (середнє) значення ОГ для кожного зразка.

7.4 Остаточний розрахунок для зразків сечі

Обчисліть 24-годинну екскрецію для кожного зразка сечі: мкг/24 год = мкг/л x л/24 год

<u>приклад</u>:
Концентрація зразка сечі, зчитана зі стандартної кривої = 500 пг/мл
Результат після корекції з коефіцієнтом розведення 19 = 9500 пг/мл
9500 пг/мл / 1000 = 9,5 мкг/л

Загальний об'єм 24-годинної сечі = 1,3 л (приклад)

9,5 мкг/л × 1,3 л/24 год = 12,35 мкг/24 год

7.4.1 Приклад типової стандартної кривої

Наступні дані лише для демонстрації та не можуть використовуватися замість генерованих даних під час аналізу.

Стандартний	Оптична густина (450 нм)
Стандарт А (0 пг/мл)	2,040
Стандарт Б (20 пг/мл)	1,634
Стандарт С (80 пг/мл)	0,966
Стандарт D (200 пг/мл)	0,516
Стандарт Е (500 пг/мл)	0,223
Стандарт F (1000 пг/мл)	0,130

8. ЕТАЛОННІ ЗНАЧЕННЯ

Значення наведено лише для ознайомлення користувача.

Для кожної лабораторії наполегливо рекомендується встановити власні специфічні значення, які враховують корінне населення території, де розташована лабораторія.

Значення вище або нижче контрольного діапазону слід розглядати як підозрілі та потребувати додаткового тестування. Результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Результати слід співвіднести з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

8.1 Зразки сироватки/плазми

У дослідженні, проведеному з К**3-Зразки плазми EDTA** зовні нормальних здорових дорослих, використовуючи Альдостерон ІФА спостерігаються такі значення:

Здорові дорослі	п	Середній (пг/мл)	Медіана (пг/мл)	$2.5^{тис}$– $97,5^{тис}$Процентиль (пг/мл)	Діапазон (мін. – макс.) (пг/мл)
Лежаче положення	60	56.14	39,71	14,21 – 156,47	8,58 – 272,30
Вертикальне положення	60	77,48	58,00	13.37 – 233.55	12,87 – 358,50

Ці значення також дійсні для сироватки K_2-EDTA плазма, літій-гепарин плазма і цитрат 3,2% плазма.

Ці результати добре відповідають опублікованим референтним діапазонам[8, 15].

У дослідженні, проведеному з начебто нормальними здоровими дорослими, з використанням альдостерону ІФА (MS E-5200) і

ІФА з активним реніном (MS E-5300) у плазмі визначали такі співвідношення альдостерон-ренін:

Співвідношення альдостерон-ренін

	п	Середній (пг/мл / пг/мл)	Медіана (пг/мл / пг/мл)	$2.5^{тис}$– $97,5^{тис}$Процентиль (пг/мл / пг/мл)
Здорові дорослі (K_3EDTA)	89	8,68	5.30	0,52 – 37,83

Ці значення також дійсні для сироватки K_2-EDTA плазма, літій-гепарин плазма і цитрат 3,2% плазма.

Ці результати добре відповідають опублікованим референтним діапазонам[16].

8.2 Зразки сечі

У дослідженні, проведеному із зразками сечі (24-годинної сечі) начебто нормальних здорових дорослих, з використанням

Альдостерон ІФА спостерігаються такі значення:

	п	Середній (мкг/24 год)	Медіана (мкг/24 год)	$2.5^{тис}$– $97,5^{тис}$Процентиль (мкг/24 год)	Діапазон (мін. – макс.) (мкг/24 год)
Здорові дорослі	8	11.34	9.40	3.31 – 25.09	3.06 – 27.17

Ці результати добре відповідають опублікованим референтним діапазонам[8].

Результати самі по собі не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Результати повинні бути співвіднесені з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.

9. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Гарантія якості в лабораторії вимагає, щоб контроль проводився з кожною стандартною кривою. Необхідно проаналізувати статистично значущу кількість контролів, щоб встановити середні значення та прийнятні діапазони для забезпечення належної продуктивності.

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних і федеральних норм. Рекомендується використання контрольних зразків для забезпечення повсякденної достовірності результатів. Використовуйте контроль як на нормальному, так і на патологічному рівнях.

Контролі та відповідні результати лабораторії контролю якості вказані в Сертифікаті аналізів (CoA), який додається до набору. Значення та діапазони, зазначені в сертифікаті придатності, завжди стосуються поточної партії набору і повинні використовуватися для прямого порівняння результатів.

За наявності, також рекомендується використовувати національні або міжнародні програми оцінки якості, щоб забезпечити точність результатів.

Застосовуйте відповідні статистичні методи для аналізу контрольних значень і тенденцій. Якщо результати аналізу не відповідають встановленим прийнятним діапазонам контрольних матеріалів, результати пацієнтів слід вважати недійсними. У цьому випадку, будь ласка, перевірте наступні технічні області: пристрої дозування та часу; фотометр, терміни придатності реактивів, умови зберігання та інкубації, методи аспірації та промивання.

Перевіривши вищезазначені пункти і не знайшовши жодних помилок, зверніться безпосередньо до свого дистриб'ютора або виробника.

10. ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

10.1 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Речовини, перелічені нижче, були перевірені на перехресну реактивність аналізу. Перехресна реактивність повинна бути < 10%:

Речовина	конц. Діапазон збагаченої Речовини	середній крос-реактивність (%)
11-дезоксикортизол	10 – 1000 нг/мл	0,01
17-ОН Прогестерон	1,2 – 120 нг/мл	0,00
21-ОН Прогестерон	3,5 – 350 нг/мл	0,04
Андростендіон	0,2 – 22 нг/мл	0,00
Андростерон	10 – 1000 нг/мл	0,00
BSA	1 – 100 мг/мл	0,00
Холестерин	0,5 – 50 мг/мл	0,00
Кортикостерон	0,5 – 50 нг/мл	0,15
Кортизол	8 – 800 нг/мл	0,00
Кортизон	16 – 1600 нг/мл	0,01
Креатинін	50 – 5000 мкг/мл	0,00

Речовина	конц. Діапазон збагаченої Речовина	середня крос-реактивність (%)
DHEA	0,5 – 50 нг/мл	0,03
DHEA-S	300 – 30000 нг/мл	0,00
Естрадіол	0,02 – 2 нг/мл	0,01
Естріол	1,5 – 150 нг/мл	0,00
Естрон	0,01 – 1 нг/мл	0,05
Глюкоза	1 – 100 мг/мл	0,00
Преднізолон	35 – 3500 нг/мл	0,00
Преднізон	35 – 3500 нг/мл	0,00
Прегненолон	35 – 3500 нг/мл	0,00
Прогестерон	42,2 – 4220 нг/мл	0,00
Тестостерон	0,01 – 1 нг/мл	0,00

10.2 Можливість виявлення

Розраховано відповідно до рекомендацій CLSI EP17-A2:2012.

	Сироватка	сеча
Обмеження бланка (LoB)	5,359 пг/мл	
Межа виявлення (LoD)	7,374 пг/мл	8,902 пг/мл
Межа кількісного визначення (LoQ)	10,647 пг/мл	15,665 пг/мл
Нижня межа лінійного інтервалу (LLLI)	14,144 пг/мл	21200 пг/мл
Діапазон вимірювання	7,374 пг/мл – 1000 пг/мл	8,902 – 1000 пг/мл
Лінійний діапазон	14,144 пг/мл – 1000 пг/мл	21.200 – 1000 пг/мл

10.3 Повторюваність і відтворюваність

Розроблено на основі рекомендацій CLSI EP5-A3:2014.

10.3.1 Повторюваність

Повторюваність була визначена для 4 зразків пацієнтів, які охоплювали повний діапазон вимірювань протягом 20 днів у 2 незалежних сеансах на день. CV розраховували як середнє CV 40 прогонів. CV має бути < 10%.

Сироватка	n	Середнє (пг/мл)	CV (%)
1	5	55,66	6.5
2	5	88,88	6.7
3	5	325,82	3.8
4	5	709,07	4.5

сеча	n	Середнє (пг/мл)	CV (%)
1	5	88,47	4.3
2	5	167,59	6.4
3	5	343,98	5.5
4	5	634,55	5.9

10.3.2 Відтворюваність (точність між серіями)

Точність між серіями була визначена для 4 зразків, що охоплювали повний діапазон вимірювань. 4 зразки були виміряні протягом 5 днів з 5 реплікатами на прогін. Таку ж процедуру проводили з 4 зразками сечі.

Сироватка	n	Середнє (пг/мл)	CV (%)
1	25	55,66	7.4
2	25	88,88	9.8
3	25	325,82	6.5
4	25	709,07	9.6

сеча	n	Середнє (пг/мл)	CV (%)
1	25	88,47	8.2
2	25	167,59	7.3
3	25	343,98	7.5
4	25	634,55	8.3

10.3.3 Відтворюваність (точність між партіями)

Варіації між партіями визначалися 6 вимірюваннями різних зразків з 3 різними партіями набору. CV має бути < 15%.

Сироватка	n	Середнє (пг/мл)	CV (%)
1	18	56,78	8.8
2	18	95,41	7.7
3	18	309,52	8.1
4	18	637,70	9.4

10.4 Відновлення

Відновлення визначали шляхом додавання зростаючої кількості аналіту до різних зразків пацієнтів, що містять різну кількість ендогенного аналіту. Відсоток відновлення визначали шляхом порівняння очікуваних і виміряних значень зразків.

Тип зразка		K_3 EDTA	Лі-Гепарин	Цитрат 3,2%	Сироватка	сеча	сеча	сеча	сеча
Найвища додана концентрація [пг/мл]		80,58	80,58	80,58	94,42	168,95	168,95	121,98	69,69
Концентрація [пг/мл]		19.25	49,52	298,45	589,33	79,50	153.08	178,98	233,42
Середнє відновлення [%]		92,0	100,0	104.5	94.5	99,9	98,8	103,0	100,6
Діапазон відновлення [%]	**від**	87.4	91.2	95.7	90.9	94.8	95.1	98,9	98.4
	до	103.4	112.8	112.4	98.2	103,0	104.3	104.6	105.3

10.5 Лінійність

Зразки, що містять різні кількості аналіту, були серійно розведені стандартом А. Відсоток відновлення розраховувався шляхом порівняння очікуваних і виміряних значень для аналіту.

Тип зразка		Лі-Гепарин	K_3 EDTA	Сироватка	Сироватка	сеча	сеча	сеча	сеча
Найвище розведення		1:16	1:16	1:64	1:2	1:16	1:16	1:8	1:2
Концентрація [пг/мл]		517.12	241,39	1085,81	85,90	379,70	592,90	1012,49	96,87
Середній Відновлення [%]		98.4	102.5	100,8	111,0	90,5	108.9	76,24	100,28
Діапазон Відновлення [%]	**від**	92.7	93.8	88.3	108.5	85.8	106.5	86.2	90.7
	до	102.9	110.2	96.5	112.3	93.5	110.2	105.8	110.8

11. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані, якщо процедура аналізу виконується з повним розумінням інструкцій із застосування та згідно з інструкціями щодо лабораторного забезпечення якості. Будь-яке неналежне поводження зі зразками або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

11.1 Речовини, що заважають

11.1.1 Матричні перешкоди

Не було виявлено жодних перешкод (похибка < ± 20%) для додавання інтерференції до концентрації, зазначеної в таблиці нижче.

Білірубін некон'югований	до 0,3 мг/мл
Білірубін кон'югований	до 0,1 мг/мл
Гемоглобін	до 2,0 мг/мл
Тригліцерид	до 7,5 мг/мл
Холестерин	до 4,0 мг/мл
Етанол	до 0,5 мг/мл
Глюкоза	до 12,5 мг/мл

11.1.2 Інтерференція гетерофільних антитіл

Зразки пацієнтів можуть містити гетерофільні антитіла, включаючи ендогенні, поліклональні, слабко поліспецифічні людські антимишачі антитіла (HAMA) та ендогенні, моноспецифічні високоафінні людські антитваринні антитіла (HAAA). Гетерофільні антитіла в зразку можуть спричинити хибнопозитивні (переважно) або хибнонегативні результати імуноаналізів[17].
Однак загальновизнано, що гетерофільні антитіла не впливають на конкурентне зв'язування, імунофелометричні та імунотурбідиметричні аналізи.[19]. Оскільки ІФА на альдостерон має конкурентоспроможний формат аналізу, тестування на наявність гетерофільних антитіл не проводилося.

11.1.3 Вплив аутоантитіл

Зразки пацієнтів можуть містити аутоантитіла, включаючи ревматоїдні фактори (РФ), які спрямовані проти ендогенних речовин пацієнта. Аутоантитіла можуть спричиняти хибнопозитивні (переважно) або хибнонегативні результати імуноаналізів[17]. В імунологічному аналізі вони реагують подібно до гетерофільних антитіл.
Гетерофільні антитіла в зразку можуть спричинити хибнопозитивні (переважно) або хибнонегативні результати імуноаналізів[9].
Однак загальновизнано, що гетерофільні антитіла не впливають на конкурентне зв'язування, імунофелометричні та імунотурбідиметричні аналізи.[19]. Оскільки ІФА на альдостерон має конкурентоспроможний формат аналізу, тестування на наявність аутоімунних антитіл і РФ не проводилося.

11.1.4 Вплив ліків

Випробовувалися такі препарати. Похибка має бути < 10%.

Речовина	Діапазон концентрацій шип Речовина (нг/мл)	Середній Упередженість (%)
Верапаміл	21.6 – 2160	-1,91
Еналаприл	4.24 – 424	-2,53
Ацетилсаліцилова кислота	652 – 65200	-0,38
Парацетамол	2000 рік – 200 000	-3,47
спіронолактон	6 – 600	-1,93
Празозин HCl	120 – 12000	-0,99
Флудрокортизон	20 – 2000 рік	6.59
L-аскорбінова кислота	600 – 60000	1.39
Фуросемід	60 – 6000	4.70
Дексаметазон	20 – 2000 рік	4.93

11.2 Ефект хука високої дози

«Ефект гака високої дози» не виявляється до 20 000 пг/мл альдостерону.

11.3 Правдивість (упередженість)

Аналіз відкалібровано в діапазоні еталонного матеріалу (Сертифікований еталонний матеріал Cerilliant A-096). Різниця від очікуваного значення була нижче ± 20%.

Концентрація	Упередженість	Невизначеність довідковий матеріал
50,00 пг/мл	-6,7%	5,0%
150 пг/мл	-7,3%	2,7%
700 пг/мл	-8,4%	1,6%

12. ЮРИДИЧНІ АСПЕКТИ

12.1 Достовірність результатів

Випробування необхідно проводити точно відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися вказівок із забезпечення якості лабораторії та відповідних національних стандартів і/або законів. Це особливо актуально для використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в процедуру тестування достатню кількість контролів для підтвердження точності та прецизійності тесту.

Результати тесту дійсні, лише якщо всі контролі знаходяться в межах зазначених діапазонів і якщо всі інші параметри тесту також відповідають специфікаціям аналізу. Якщо є сумніви чи занепокоєння щодо результату, зверніться до виробника.

12.2 Терапевтичні наслідки

Терапевтичні наслідки ніколи не повинні базуватися лише на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати тестів узгоджуються з пунктами, як зазначено в пункті 11.1. Будь-який лабораторний результат є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта.

Лише в тих випадках, коли лабораторні результати прийнятно збігаються із загальною клінічною картиною пацієнта, слід виводити терапевтичні наслідки.

Сам результат тесту ніколи не повинен бути єдиним визначальним фактором для отримання будь-яких терапевтичних наслідків.

12.3 Відповідальність

Будь-яка модифікація тестового набору та/або заміна чи змішування будь-яких компонентів різних партій з одного тестового набору на інший може негативно вплинути на очікувані результати та валідність загального тесту. Такі модифікації та/або обміни роблять будь-які вимоги щодо заміни недійсними.

Претензії, подані через неправильне тлумачення клієнтом результатів лабораторних досліджень відповідно до пункту 11.2, також є недійсними. Незважаючи на це, у разі будь-якої претензії відповідальність виробника не повинна перевищувати вартість тестового набору. Виробник не несе відповідальності за пошкодження тестового набору під час транспортування.

12.4 Повідомлення про серйозний інцидент

Про будь-який серйозний інцидент, який стався з пристроєм, необхідно повідомити виробника та компетентний орган держави-члена, у якій проживає користувач та/або пацієнт.

13. ЛІТЕРАТУРА

1. Brown RD, Strott CA та Liddle GW. Місце стимуляції біосинтезу альдостерону ангіотензином і калієм. J Clin Invest. 1972, 51 (6), 1413–8.
2. Bauer JH, Gauntner WC. Вплив хлориду калію на активність реніну плазми та альдостерон плазми під час обмеження натрію у здорової людини. Kidney Int. 1979, 15 (3): 286–93.
3. Вільямс Г.Х., Длугий Р.Г. Біосинтез альдостерону. Взаємозв'язок факторів регулювання. Am J Med. 1972, 53 (5), 595–605.
4. Tiu SC та ін. Використання альдостерон-ренінового співвідношення як діагностичного тесту первинного гіперальдостеронізму та його тестова характеристика за різних умов забору крові. J Clin Endocrinol Metab. 2005, 90 (1), 72-8.
5. Mulatero P та ін. Підтверджуючі тести в діагностиці первинного альдостеронізму. Horm Metab Res. 2010, 42 (6), 406-10.
6. Кільо А.Р. Первинний альдостеронізм: результати адреналектомії при непоодинокій аденомі. J Am Coll Surg. 2011, 213 (1), 106-12.
7. Grossmann C і Gekle M. Нові аспекти швидкої передачі сигналів альдостерону. Mol Cell Endocrinology 2009, 308 (1-2), 53-62.
8. Томас Л (редактор). Ренін-ангіотензин-альдостерон-система (РААС). *8тис видання; Пологи та діагностика*2012, 1558.
9. Perschel FH та ін. Швидкий скринінговий тест на первинний гіперальдостеронізм: співвідношення альдостерону в плазмі крові до концентрації реніну визначається повністю автоматизованим хемілюмінесцентним імуноаналізом. *Clin. Хімія*2004; 50 (9), 1650-55.
10. Rege J та ін. Стероїдні біомаркери при захворюваннях надниркових залоз людини. J Steroid Biochem Mol Biol. 2019 190: 273–280.
11. Raff H та ін. Фізіологічні основи етіології, діагностики та лікування захворювань надниркових залоз: синдрому Кушинга, надниркової недостатності та вродженої гіперплазії надниркових залоз. *Compr Physiol. 2014 рік; 4(2): 739–769*.
12. Tsilosani A, Gao C, Zhang W. Aldosterone-Regulated Sodium Transport and Blood Pressure. Фронт фізіол. 2022; 13: 770375.
13. Yozamp N та ін. 2021. Внутрішньоіндивідуальна варіабельність концентрації альдостерону при первинному альдостеронізмі: наслідки для виявлення випадків. Гіпертонія, 2021; 77(3), 891-899.
14. Kawarazaki W і Fujita T. Роль альдостерону в пов'язаній з ожирінням гіпертензії. Американський журнал гіпертонії 2016; 29(4), 415-423.
15. Eisenhofer G та ін. Референтні інтервали для концентрації надниркових стероїдів у плазмі, виміряні за допомогою РХ-МС/МС: вплив статі, віку, оральних контрацептивів, індексу маси тіла та статусу артеріального тиску. Clin Chim Acta 2017; 470, 115-124.
16. Керстенс М та ін. Референтні значення для співвідношень альдостерон-ренін у осіб з нормальним тиском і вплив змін у споживанні натрію з їжею. *Clin.Chem. 2011 рік; 57:11, 1607-1611*.
17. Газаль та ін. Втручання в імунологічний аналіз гормонів: Оновлення 2021 року. Ann Lab Med. (2022) 42 (1): 3-23.
18. Guder WG Якість діагностичних зразків; Рекомендація робочої групи з преаналітичної якості Німецького товариства клінічної хімії та Німецького товариства лабораторної медицини, 2010, 3rd видання, GIT Verlag GmbH.
19. Дімескі Г. Тестування на перешкоди. Clin Biochem Rev 2008; 29 Додаток, 43-48.

Умовні позначення:

Температура зберігання	Виробник	Містить достатньо для <N> випробувань
Дата закінчення терміну придатності	**LOT** Код партії	**IVD** Тільки для ін вітро діагностики в лабораторних умовах!
Звертайтесь до інструкції по експлуатації	**CONT** зміст	CE Маркування
Обережно	**REF** Каталожний номер	