

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАНИЛИЛМИНДАЛЬНОЙ КИСЛОТЫ (ВМК)

**408-1050, Immunoplate VMA**

Каталог. № : 408-1050  
Количество : 96  
Производитель: **ВСМ (США)**

Методика от 02-2013



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

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного измерения *in vitro* концентрации ванилилминдальной кислоты (ВМК) в моче пациента.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Среди спектрофотометрических методов определения ВМК чаще всего используется метод Пизано, при котором ванилин измеряется напрямую при 360 нм. Однако, недостатком колориметрических методов в общем являются мешающие компоненты и много ручных стадий методики. Использование хроматографических методов с диазотированным п-нитроанилином и сообщения о тонкослойной хроматографии на силикагелях, где ВМК экстрагировалась для анализа, представляют только исторический интерес. Сравнительно недавно для анализа ВМК стали использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) с различными детекторами, включая УФ, амперометрию и послеклоночные реакции. Эти методики значительно повысили специфичность и чувствительность анализа.

Катехоламины включают в себя допамин (находится преимущественно в центральной нервной системе), норэпинефрин (главным образом в симпатической нервной системе) и эпинефрин (в основном в мозговом веществе надпочечника). Они находятся в виде неактивных комплексов. Выделенные катехоламины, имея маленький период полураспада, берутся симпатическими нервными окончаниями или метаболизируются в печени и почках и выделяются наружу.

Ванилилминдальная кислота (ВМК) и 4-гидрокси-3-метоксиминдальная кислота - конечные продукты катаболизма и эпинефрина и норэпинефрина. Было доказано, что подсчет кислых метаболитов является надежным и широко используемым методом для обработки феохромоцитомы и других опухолей, выделяющих катехоламины. Феохромоцитомой страдают от 0.1% до 0.2% пациентов с повышенным давлением. Таким пациентам могут ставиться неправильные диагнозы из-за метаболических, сердечных и желудочно-кишечных симптомов, которые могут имитировать многие другие болезни. Недиагностированная или необработанная феохромоцитомы может привести к фатальному исходу. А поскольку эта болезнь хирургически излечима, ранняя диагностика повышенного выделения ВМК чрезвычайно важна.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор для определения ВМК использует твердофазный иммуноферментный анализ, основанный на конкуренции между ВМК на стенках микропланшета и в моче за моноклональные антитела. Основные шаги следующие:

- 1) Добавление образцов и реакция: Образцы инкубируются в ячейках с пероксидазой хрена, конъюгированной с анти-ВМК моноклональными антителами.
- 2) Промывка: Несвязавшаяся ВМК и антитела, связанные с ВМК из мочи, удаляются промывкой 0.9% раствором NaCl.
- 3) Ферментная реакция (развитие окраски): Количество связанной пероксидазы обратно пропорционально концентрации ВМК, присутствующей в образце мочи. При добавлении субстрата (ТМБ) развивается голубая окраска, которая изменяется на голубую при добавлении стоп-раствора. Ее интенсивность обратно пропорциональна концентрации ВМК в калибраторе или образце мочи.
- 4) Считывание оптической плотности: После добавления стоп-раствора измеряется оптическая плотность при 450 нм. По калибровочной кривой находится концентрация неизвестного образца.

## ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

- 1) Микропланшет с привитой ВМК, 96 ячеек
- 2) Анти-ВМК-ферментный конъюгат: пероксидаза хрена, конъюгированная с анти-ВМК моноклональными антителами, 10 мл
- 3) ВМК/ГВК реагент развивающий окраску: раствор тетраметилбензидина (20 мл)
- 4) ВМК/ГВК стоп-раствор: 2 N серная кислота (20 мл)
- 5) Набор стандартов ВМК: 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 1, 2, 4 и 8 мкг/мл в фосфатном буфере, 0.01M, pH 7.4 (по 1 мл каждый).

## ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, не поставляемые с набором

- 1) Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм
- 2) pH метр или pH-бумага с диапазоном 5.0-10.0
- 3) Микропипетки с наконечниками на 10, 50 и 100 мкл
- 4) Микропипетки с наконечниками на 50 и 100 мкл
- 5) Цилиндры на 10 и 100 мл
- 6) Серологические пипетки на 10 мл
- 7) Одноразовые пробирки или сосуды
- 8) Раствор 5N NaOH
- 9) Раствор 5N HCl
- 10) Микропланшетный вошер (опция)
- 11) Микропланшетный инкубатор (опция)
- 12) Хлорид натрия или солевой раствор
- 13) 0.01 M фосфатно-солевой буфер, pH 7.4

## ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

- 1) Приготовить 0.01 M фосфатный солевой буфер, pH 7.4. Этот раствор используется для разбавления неизвестных образцов перед анализом.
- 2) Перед анализом приведите все образцы мочи и реагенты при комнатной температуре (15-30°C) и хорошо перемешайте.
- 3) Приготовьте все реагенты и образцы мочи перед началом анализа. Для получения хороших результатов процедура анализа должна быть выполнена без пауз.

## ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Набор предназначен для диагностики *in vitro*.
2. Компоненты набора разработаны как единое целое.
3. Компоненты из различных лотов не должны смешиваться.
4. Не используйте калибраторы набора для других целей, например, для ВЭЖХ.
5. Для предотвращения загрязнений используйте новый наконечник для каждого калибратора или пробы мочи.

## ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8°C в холодильнике.
2. Стрипы нужно хранить в закрытом пакете с осушителем. Вынимайте плашку только когда необходимо.
3. Сроки годности реагентов указаны на этикетках. Раствор развивающий окраску должен быть бесцветным.
4. Защищайте реагенты и реакционные смеси от попадания прямых солнечных лучей.

## СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Должна быть отобрана проба 24-часовой мочи с 10 мл 6N HCl в качестве консерванта. Случайно отобранные пробы должны быть доведены до pH между 2 и 3 немедленно после отбора. Запишите общий объем и сохраните 1-5 мл для анализа ВМК и общего креатинина. Все образцы должны быть в холодильнике перед тестированием. Отцентрифугируйте мутные образцы мочи или пробы с кристаллами или осадками.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

### А. Приготовление реагентов

- 1) Промывочный раствор: растворите 9 г NaCl в 1 литре дистиллированной или деионизированной воды. Также может быть использован соляной раствор.

### В. Приготовление образцов

- 1) Возьмите 1 мл подкисленной мочи и перенесите в одноразовую микропробирку, в которой будет устанавливаться необходимый pH.
- 2) Приведите pH всех образцов в диапазон от 6 до 9, добавляя маленькие количества 5N NaOH (например по 5 мкл), контролируя pH на pH-метре или pH-бумажкой.
- 3) Разбавьте приготовленные таким образом образцы в соотношении 1:10 фосфатно-солевым буфером. pH разбавленных образцов должен быть между 7 и 8.

### С. Стандартная процедура анализа

- 1) Приготовьте рабочий листок с расположением стандартов и образцов (рис. 1).
- 2) Добавление образцов:

- а. Добавьте 50 мкл калибраторов ВМК в соответствующие ячейки.  
 б. Добавьте 50 мкл разбавленных (1:10) контролей или образцов в соответствующие ячейки.
- 3) Добавление анти-ВМК-ферментного конъюгата:  
 Добавьте 50 мкл анти-ВМК ферментный конъюгат в каждую ячейку, используя диспенсер.
- 4) Реакция антиген-антитело:  
 Перемешайте плашку передвижением ее взад-вперед в слабом горизонтальном движении в течение одной минуты. Для этих целей может быть использован микропланшетный шейкер. Позвольте плашке постоять при комнатной температуре (15-30°C) в течение одного часа.
- 5) Промывка:  
**Промывать только один раз.** Удалите инкубационную смесь декантацией плашки в раковину и промокните плашку фильтровальной бумагой. Раскапайте 300 мкл солевого раствора в каждую ячейку. Удалите раствор декантацией плашки в раковину и промокните плашку фильтровальной бумагой. Промывка может быть сделана также на микропланшетном вошере.
- 6) Ферментная реакция:  
 Добавьте 100 мкл ВМК/ГВК реагента развивающего окраску в каждую ячейку и позвольте постоять в течение 25 минут при 15-30°C.
- 7) Прекращение образования окраски:  
 Добавьте 100 мкл ВМК/ГВК стоп-раствора в каждую ячейку.
- 8) Измерение оптической плотности:  
 Может быть использован любой ридер с длиной волны 450 нм.

#### D. Расчет результатов

- 1) Используя логарифмическую или полулогарифмическую бумагу постройте калибровочную кривую, откладывая по оси абсцисс концентрацию ВМК, а по оси ординат - оптическую плотность. Концентрации ВМК в неизвестных образцах вычисляются по этой кривой.

Пример:

Образец	Опт. Плотность	Отношение В/Во(%)	ВМК мкг/мл
Стандарты			
0 мкг/мл	1.487 1.466	100.0	
0.0625	1.255 1.258	85.1	
0.125	1.037 1.052	70.7	
0.25	0.818 0.839	56.1	
1	0.359 0.378	25.0	
2	0.245 0.261	17.1	
4	0.145 0.145	9.8	
8	0.078 0.084	5.5	
Проба А	1.229 1.218	82.9	0.072 x 10
Проба В	0.769 0.746	51.3	0.285 x 10
Проба С	0.522 0.522	35.4	0.600 x 10

Результаты, представленные выше, показывают концентрацию ВМК в мкг/мл. Если требуется общее количество ВМК в 24-часовой пробе:  

$$\frac{\text{ВМК (мкг/мл)} \times \text{объем мочи (мл)}}{1000} = \text{ВМК, мг/24 часа}$$

или когда требуется отношение ВМК/креатинин:

$$\frac{\text{ВМК (мкг/мл)}}{[\text{Креатинин (мг/дл)}]/100} = \text{ВМК мкг/мг Креатинина}$$

или = ВМК мг/г Креатинина

- 2) Расчет может быть проведен на компьютере с использованием калибровочной кривой, основанной на 4 коэффициентах log-logit.

*Все приведенные данные служат только для иллюстрации и не могут быть использованы для построения калибровочной кривой.*

#### ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- Очень важно промывать микроячейки тщательно, удаляя из них весь остаток жидкости.
- Пипетируйте калибраторы или образцы мочи на дно каждой ячейки. Перемешивание ячеек после каждого пипетирования не требуется.
- Оптическая плотность - функция времени инкубации и температуры. Следовательно, необходимо обеспечить одинаковое время инкубации без пауз.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Набор предназначен только для количественного измерения ВМК в моче.

- Все образцы с концентрацией ВМК больше, чем 8 мкг/мл должны быть проанализированы повторно с большим разбавлением, например 1:20.
- Влияние азид натрия: Так как азид натрия замедляет ферментную реакцию, любой буфер, содержащий азид натрия в качестве консерванта, не должен использоваться для разбавления образцов мочи.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для мониторинга за качеством набора рекомендуется, чтобы контрольные материалы (например, фирмы Bio-Rad) включались в каждую постановку анализа.

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных значений в соответствии с характеристиками тестируемого населения. Значения, приведенные ниже, получены для проб 24-часовой мочи, собранной от 280 пациентов в США.

	ВМК мг/день	ВМК мг/г креатинина
Число образцов	280	280
Среднее (X)	7.92	6.87
± 2 S.D. диапазон	0.40-15.44 (рис. 2)	0.00-14.37 (рис. 3)

Измеренное количество ВМК (мг/день)

Рис. 2. Распределение ВМК, выделенной за день, у 280 нормальных пациентов.

Измеренное количество ВМК (мг/г креатинина)

Рис. 3. Распределение концентрации ВМК у 280 нормальных пациентов.

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

##### Извлечение

а. К четырем образцам мочи здоровых пациентов добавлялась ВМК в различных концентрациях. Результаты показаны в таблице.

	Эндог. (мкг/мл)	Добавка (мкг/мл)	Ожидаемое (мкг/мл)	Измеренное (мкг/мл)	Извлечение (%)
A	1.76	0.00			
	0.88	9.60	10.48	10.10	192
	1.32	4.80	6.12	5.92	97
	1.54	2.40	3.94	3.90	99
	1.65	1.20	2.85	2.78	98
B	6.16	0.00			
	3.08	9.60	12.68	12.85	101
	4.62	4.80	9.42	9.55	101
	5.39	2.40	7.79	8.00	102
	5.77	1.22	6.97	7.29	104
C	11.71	0.00			
	5.85	9.60	15.45	15.85	102
	8.78	4.80	13.58	18.77	101
	10.24	2.40	12.64	12.61	99
	10.98	1.20	12.18	13.30	109
D	8.43	0.00			
	4.21	9.60	13.81	15.14	109
	6.32	4.80	11.12	11.34	102
	7.37	2.40	9.77	10.34	105
	7.90	1.20	9.10	9.27	101

##### Линейность

Четыре образца мочи и два контроля Био-Рад были разбавлены солевым фосфатным буфером.

Было вычислено соотношение (В/Во) для каждого разбавления (В) к опт. плотности 0 стандарта, данные показаны на графике. (рис. 4)

Рис. 4. Тест на линейность. (См. оригинал инструкции)

##### Воспроизводимость

а. Коэффициент вариации внутри серии определялся для трех образцов мочи с разными концентрациями ВМК:

	образец А	образец В	образец С
число	26	24	24
среднее (мкг/мл)	0.192	8.25	11.24
S.D. (мкг/мл)	0.06	0.52	0.71
коэф. вар. (%)	6.0	6.3	6.0

б. Коэффициент вариации между сериями определялся для трех образцов мочи с разными концентрациями ВМК:

	образец А	образец В	образец С
число	16	19	19
среднее (мкг/мл)	1.193	2.821	9.698
S.D. (мкг/мл)	0.086	0.232	0.686
коэф. вар. (%)	5.7	8.2	7.1

#### Специфичность

Следующие вещества были оценены на перекрестные реакции к набору. Процент перекрестных реакций выражается в терминах процентной концентрации каждого вещества, которая дает 50% замещение.

Вещество	% перекр. Реакций
ВМК	100
Гомованилиновая кислота	< 0.01
DL-3,4-дигидроксиминдальная кислота	4
DL-3,4-дигидроксифенилуксусная кислота	< 0.01
Метанефрин	< 0.01
Ванилилпуриевая кислота	4
Ванильная кислота	< 0.01
Дофамин	< 0.01
5-гидрокси-3-индоуксусная кислота	< 0.01
ванилмолочная кислота	< 0.01
3-метокси-4-гидроксифенилгликол	< 0.01

#### Чувствительность

Чувствительность этого теста выше, чем 0.0625 и оценивается в 0.035 мкг/мл. Минимально детектируемая концентрация рассчитана как концентрация ВМК, которая соответствует оптической плотности на 2 стандартных отклонения от значения оптической плотности 20 определений 0 стандарта.

#### Стабильность образцов

Стабильность была проверена на двух различных образцах мочи, один из которых хранился при 4°C, а другой при -20°C. Результаты показали, что пробы можно хранить при 4 °C по крайней мере 5 дней, а при -20 °C - 50 дней.



#### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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