

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАНЕФРИНА В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

RE59181, Metanephrine ELISA

Каталог. № : **RE59181**
Количество : **96**
Производитель: **IBL (Германия)**

Методика от **03-2012**



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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментный набор предназначен для количественного определения *in vitro* метанефрина в человеческой моче в диагностических целях.

2. ВВЕДЕНИЕ

Катехоламины адреналин, норадреналин и дофамин синтезируются мозговым веществом надпочечников, в симпатической нервной системе и в мозге. Они оказывают влияние практически во всех тканях и вместе с другими гормональными и нейрональными системами участвуют в регуляции большого числа физиологических процессов.

Так как при различных заболеваниях катехоламины и их метаболиты метанефрин и норметанефрин секретируются в повышенных количествах, их можно использовать в диагностических целях.

В этом смысле особое значение приобретают диагностика и мониторинг опухолей нервной системы. Эти в первую очередь относятся к феохромоцитомам, а также нейроblastомам и ганглионевромам.

В 10% случаев феохромоцитом наблюдается злокачественный рост опухоли. Кроме того, повышение уровня катехоламинов и их метаболитов метанефрина и норметанефрина можно наблюдать при карциноидных опухолях.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Процедура определения основана на принципе конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (конкурентный ELISA). Биотинилированные и небитинилированные антигены конкурируют за ограниченное число сайтов связывания специфических антител, иммобилизованных на твердой фазе. Количество биотинилированных антигенов, связывающихся с этими антителами, обратно пропорционально концентрации анализируемого вещества в образце. После уравнивания системы несвязавшиеся биотинилированные антигены удаляются при промывке. Количество биотинилированных антигенов, связавшихся с антителами, определяют с помощью конъюгата антител к биотину с щелочной фосфатазой и субстрата р-нитрофенилфосфата (pNPP). Концентрацию антигена в исследуемых образцах рассчитывают сравнением оптической плотности в образцах с калибровочной кривой, построенной с использованием стандартов с известными концентрациями.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор предназначен только для диагностики *in vitro*. Набор должен быть использован специалистами.
2. Перед постановкой анализа внимательно прочитайте всю инструкцию. Используйте действующую версию инструкции, поставляемую с набором. Убедитесь в полном понимании всех этапов метода.
3. В случае повреждения упаковки набора, не используйте набор для анализа и свяжитесь с вашим поставщиком, не позднее чем в течение одной недели после получения заказа. Заявки по поводу повреждения упаковки должны быть направлены в письменном виде. Не используйте поврежденные компоненты, но храните их соответствующим образом до завершения обработки претензии.
4. Проверяйте номер лота и дату годности набора. Не смешивайте реагенты из разных лотов. Не используйте наборы с истекшим сроком годности.
5. Соблюдайте меры безопасности, принятые в вашей лаборатории. Работайте с реагентами и образцами в лабораторной одежде, одноразовых латексных перчатках и по необходимости в защитных очках, если необходимо.
6. Реагенты данного набора содержат опасные вещества, которые могут вызвать раздражение глаз, кожи и слизистой. Избегайте прямого контакта. Более подробная информация о составе реагентов приводится в разделе «Поставляемые реагенты» и на этикетках. Сведения о безопасности материалов приводятся на сайте производителя.
7. Химические вещества и приготовленные или использованные реагенты этого набора необходимо утилизировать как опасные отходы, в соответствии с принятыми нормами химической и биологической безопасности.
8. Избегайте контакта со стоп-раствором, он может вызвать раздражение кожи и химические ожоги.

5. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Набор Metanephrine ELISA при транспортировке не требует соблюдения особого температурного режима. Полученный набор должен храниться при температуре 2-8°C. Не допускайте попадания прямых солнечных лучей и нагревания. Условия хранения образцов и приготовленных реагентов описаны в соответствующих параграфах инструкции. Стрипы после вскрытия упаковки могут храниться до указанного срока годности, если пакет со стрипами плотно закрыт и хранится при 2-8°C.

6. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ



На *in-vivo* секрецию катехоламинов и метанефринов оказывают влияние различные продукты и лекарства. Такие продукты и препараты, как витамин B, кофе и бананы, α -метилдопа, ингибиторы MAO и COMT, лекарства, назначаемые при гипертензии, должны быть исключены не менее чем за 72 часа перед сбором образцов.

Моча

Для тестирования данным методом можно использовать образцы суточной или спонтанной мочи. Общий объем мочи, выделенной за 24 часа необходимо собрать и смешать в одном сосуде, содержащем 10 - 15 мл 6 N HCl в качестве консерванта.

Для расчета результатов определите общий объем полученный суточной мочи. **Перед анализом образцы необходимо перемешать и центрифугировать.**

Условия хранения:	< -20°C (аликвоты)	Предохранять от прямых солнечных лучей и нагревания.
Срок хранения	6 месяцев	Избегать повторных циклов оттаивания-замораживания.

7. СОСТАВ НАБОРА

В набор входят реагенты в количествах, достаточных для проведения до 96 единичных определений или до 48 определений в дублях метанефрина и норметанефрина.

1 x 12x8 MTP	Микропланшет Планшет разделяется на стрипы. Каждый стрип содержит 8 лунок, покрытых козыми поликлональными антителами к IgG кролика
1 x 7 мл ANTISERUM	Антисыворотка к метанефрину Зеленого цвета. Готовая к использованию кроличья антисыворотка, содержит фосфатный буфер, 0,1% NaN ₃ .
3 x BIOTIN LYO	Биотинилированный метанефрин Лиофилизированный, содержит биотинилированный метанефрин, Tris-буфер, < 0.1 % NaN ₃ (после растворения).
1 x 250 мкл ENCONJ CONC	Ферментный Конъюгат , концентрат (100x), содержит антитела к биотину, конъюгированные с щелочной фосфатазой, Трис-буфер, HCl, 0,01% NaN ₃ .
1 x 7 x 0,35 мл CAL A-G	Стандарты А - G : 0; 26; 64; 160; 400; 1000; 2500 мкг/л 0; 0.13; 0.33; 0.81; 2.03; 5.08; 12.7 мкмоль/л Готовы к использованию, содержат метанефрин, 0.1 М HCl.
1 x 2 x 0,5 мл CONTROL 1+2	Контроли 1 и 2 Готовы к использованию. Точные концентрации указаны на этикетках флаконов.
1 x 2.25 мл ACYLREAG	Ацилирующий Реагент Готов к использованию. Содержит диметилформамид
2 x 50 x HYDR TUB	Пробирки для гидролиза Одноразовые полистирольные пробирки (не покрытые). Дополнительно пробирки для гидролиза можно заказать у производителя, кат. № KEZZ 661.
1 x 20 мл HCL	HCl Готов к использованию. 0.1 М HCl.
1 x 50 мл ASSAYBUF CONC	Рабочий Буфер , концентрат (10x) фосфатный буфер, содержащий БСА и 1% NaN ₃ .
1 x 10 мл INDICATORBUF	Индикаторный Буфер Готов к использованию. Окрашен в пурпурный цвет. Содержит трис-буфер, феноловый красный (изменение окраски при pH<7.5).
1 x 50 мл WASHBUF CONC	Буфер для промывок , концентрат (10x) Содержит: Tris-HCl буфер, Твин, 0.2 % NaN ₃ .
1 x 12 мл PNPP SUBS	PNPP Субстратный Буфер Готов к использованию. Содержит p-нитрофенилфосфат.
1 x 15 мл PNPP STOP	Стоп-раствор Готов к использованию, Содержит 1 N NaOH и 0,25 М ЭДТА
3 шт FOIL	Адгезивные пленки для заклеивания стрипов

8. МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

1. Микропипетки для внесения объемов 10; 50; 100; 1000 мкл, обеспечивающие дозирование с погрешностью менее 3% (CV < 3%).
2. Одноразовые стеклянные пробирки (12 x 75 мм)
3. Орбитальный шейкер (200 - 900 грм)
4. Вортекс
5. Водяная баня на 90°C
6. 8-канальный микродозатор и резервуары для реагентов к нему.
7. Автоматическое или полуавтоматическое промывающее устройство, емкость для буфера для промывок
8. Микропланшетный спектрофотометр (ридер) с фильтром на 405 нм (длина волны сравнения 600-650 нм)
9. Бидистиллированная или деионизированная вода
10. Бумажные салфетки, одноразовые наконечники, таймер.

9. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА

1. Неправильное обращение с образцами или модификация процедуры анализа может отразиться на результате анализа. Вносимые объемы, время инкубации, температурный режим, последовательность стадий должны точно соответствовать, указанным в инструкции. Используемые микропипетки и другие инструменты должны быть точно откалиброваны.
2. Все стадии анализа должны проводиться без остановок. Убедитесь, что все материалы, реагенты и инструменты готовы для постановки. Выньте реагенты из холодильника и дайте им нагреться до комнатной температуры (18-25 °C), каждый флакон с реагентом необходимо аккуратно перемешать перед использованием. Перемешивайте реагенты, избегая образования пены.
3. Избегайте контаминации реагентов, микропипеток и пробирок. Используйте только новые одноразовые наконечники для каждого реагента, стандарта или образца. Не меняйте крышки на флаконах. Не используемые флаконы должны быть закрыты. Нельзя повторно использовать стрипы, пробирки, реагенты.
4. Рекомендуется проводить анализ в дублях, чтобы заметить возможные погрешности микропипеток.
5. Во избежание ошибок используйте схему планшета, где указано расположение лунок со стандартами и определенными образцами.
6. Время инкубации влияет на результат. Внесение образцов в лунки и промывку лунок необходимо проводить в одной той же последовательности и с одинаковыми скоростями. Для внесения растворов в лунки рекомендуется использовать 8-канальный дозатор.
7. Качественная промывка лунок очень важна для качества постановки анализа. Неправильная промывка дает ошибочные результаты. Рекомендуется использовать для промывки многоканальный дозатор либо автоматический вошер. Нельзя высушивать лунки между инкубациями. Не поцарапайте поверхности лунок при заливке и аспирации промывочного буфера. Аккуратно вносите все реагенты. При заливке промывочного буфера проверяйте, чтобы лунка точно заполнялась буфером. Не допускайте остатка промывочного буфера после стадии промывки.
8. Влажность влияет на покрытые лунки. Не открывайте пакет со стрипами, пока он не достигнет комнатной температуры. Неиспользуемые стрипы немедленно верните в пакет с осушителем и тщательно закройте пакет.

10. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

• Для ручной или автоматизированной процедуры

Данный набор рассчитан на проведение 96 определений, тестирование может быть проведено в 3 отдельных постановках.

Указанные ниже объемы рассчитаны для тестирования 4 стрипов в одной постановке (32 определения).

Если необходимо уменьшить количество стандартов с 7 до 6, то можно не анализировать стандарт G. В этом случае диапазон измеряемых значений сокращается до 1000 мкг/л.

Если в постановке будет использовано большее количество стрипов, необходимо соответственно изменить объемы.

10.1 Подготовка лиофилизированных или концентрированных реагентов

Не смешивайте энзимные конъюгаты метанефрина и норметанефрина в случае, если запускаете параллельно определение норметанефрина.

Развести/растворить	компонент	Добавить	Разбавитель/растворитель	Соотношение	Замечания	хранение	Стабильность
15 мл	Рабочий буфер	150 мл	Бидист. вода	1:10		2-8°C	2 недели
15 мл	Буфер для промывок	150 мл	Бидист. Вода	1:10		2-8°C	4 недели
1 флакон	Биотинилированный метанефрин	2 мл	Разведенный Рабочий буфер		Приготовьте свежий и используйте только один раз. Оставьте на 15 минут. Тщательно перемешайте, без образования пены.	< -20°C (аликвоты)	2 месяца
60 мкл	Ферментный конъюгат	6 мл	Разведенный рабочий буфер	1:101	Приготовьте свежий и используйте только сразу	18-25°C	5 часов

10.2 Гидролиз образцов мочи, стандартов и контролей для определения общего метанефрина (в пробирках для гидролиза)

	Гидролиз необходим для определения <u>общего</u> норметанефрина и общего метанефрина. При анализе <u>свободных</u> норметанефрина и метанефрина гидролиз проводить не требуется. Образцы, концентрации в которых выше, чем концентрация самого высокого стандарта, должны быть разведены 0.1 М HCl перед началом гидролиза.
--	---

10.2.1 Приготовление образцов в пробирках для гидролиза

1	Внесите по 10 мкл стандартов, образцов мочи пациентов и контролей в соответствующие пробирки для гидролиза.
2	Внесите по 40 мкл 0.1 N HCl в каждую пробирку.
3	Закройте пробирки крышками и гидролизуйте 1 час при 90°C . Затем охладите до комнатной температуры. Перемешайте на вортексе.
4	Внесите по 100 мкл индикаторного буфера в каждую пробирку. Перемешайте на вортексе.
5	Добавьте в каждую пробирку по 20 мкл Ацилирующего Реагента и немедленно перемешайте на вортексе. Убедитесь, что ацилирующий реагент полностью внесен во все пробирки.
6	Закройте пробирки и инкубируйте 15 минут при комнатной температуре .
7	Внесите по 1 мл готового разведенного рабочего буфера в каждую пробирку и перемешайте на вортексе.

11. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

В микропланшете, для ручной или автоматизированной постановки

1	Внесите по 50 мкл каждого ацилированного стандарта, ацилированного контроля и ацилированного образца в соответствующие лунки микропланшета.
2	Внесите по 50 мкл биотинилированного метанефрина во все лунки.
3	Внесите по 50 мкл антисыворотки к метанефрину во все лунки.
4	Закройте планшет адгезивной пленкой, аккуратно шейкируйте и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (RT) на орбитальном шейкере (500 rpm) .
5	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку с помощью автоматического вошера 6 раз по 250 мкл готовым буфером для промывок (вручную 3 раза по 250 мкл) . После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постукав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
6	Добавьте в каждую лунку по 150 мкл свежее приготовленного ферментного конъюгата .
7	Закройте планшет новой адгезивной пленкой. Инкубируйте 30 минут при RT (18-25°C) на орбитальном шейкере (500 rpm) .
8	Удалите с планшета адгезивную пленку. Удалите инкубационный раствор из лунок. Промойте каждую лунку с помощью автоматического вошера 6 раз по 250 мкл готовым буфером для промывок (вручную 3 раза по 250 мкл) . После промывки тщательно удалите остатки буфера для промывок, постукав перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
9	Для внесения субстратного раствора и стоп-раствора рекомендуется использовать 8-канальный дозатор. Внесение субстрата и стоп-раствора должно выполняться в одном и том же порядке и с одинаковой скоростью. Избегайте образования пузырей.
10	Внесите в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата PNPP
11	Инкубируйте в течение 40 минут при RT (18-25°C) на орбитальном шейкере (500 об/мин) .
12	Остановите реакцию добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-раствора . Коротко перемешайте содержимое лунок аккуратно постукав по краю микропланшета.
13	Измерьте в лунках оптическую плотность (ОП) при 405 нм с помощью ридера (длина волны сравнения 600-650 нм) в течение 60 минут после добавления стоп-раствора.

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Результаты анализа можно считать достоверными, если процедура анализа была выполнена в полном соответствии с данной инструкцией. Кроме того, необходимо строго соблюдать правила GLP (Good Laboratory Practice, хорошей лабораторной практики) или иных норм качества, установленных в вашей лаборатории. Результаты, полученные при тестировании контролей, входящих в состав набора, должны лежать в диапазонах допустимых значений, указанных на этикетках флаконов.

Если эти критерии не выполняются, то постановка считается недействительной и тестирование должно быть выполнено еще раз. Каждая лаборатория должна использовать образцы с известными значениями для дополнительного контроля.

В случае повторного получения недостоверных результатов необходимо проверить следующие технические характеристики: сроки годности реагентов (приготовленных), условия хранения, пипетки, оборудование, условия инкубации и методику промывки.

Рекомендуется участвовать в соответствующих программах внешнего контроля качества (QC).

Замечания для участников программ контроля качества

Производитель регулярно принимает участие в программе контроля качества для данного набора. В некоторых программах QC для обогащения образцов используют рацемическую смесь (+/-) метанефрина, а не биологически активную форму метанефрина. Соответственно, при измерении иммуоферментным методом обогащенных образцов с высокой концентрацией, результаты снижены примерно на 30-40% по сравнению с измерениями методом ВЭЖХ.

Если в программе используются нативные образцы с повышенными значениями метанефрина, то такой проблемы не возникает. Причина заключается в том, что антитела, использованные в данном методе, распознают только биологически активную форму метанефрина. Пожалуйста, при интерпретации результатов проверьте способ приготовления образцов в программе QC, в которой лаборатория принимает участие.

13. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Постройте калибровочную кривую с помощью соответствующего программного обеспечения или на полупологарифмической бумаге. Полученные значения ОП стандартов откладывают по линейной оси Y, а соответствующие концентрации стандартов по логарифмической оси X. Рекомендуется использовать аппроксимацию кубическим сплайном, четырехпараметрическую или Logit-Log.

При расчете калибровочной кривой используйте значения ОП всех стандартов (из значений, полученных для дублей, можно исключить одно резко отклоняющееся значение, и использовать второе, более подходящее).

Концентрация аналита в образцах может быть рассчитана из калибровочной кривой.

Если в ходе анализа образцы были разведены, то полученные результаты требуется умножить на соответствующий коэффициент разведения.

Образцы, концентрация аналита в которых выше концентрации в самом высоком стандарте должны быть разведены дополнительно, как это описано в данной инструкции, и проанализированы еще раз.

Расчет 24 ч экскреции для каждого образца мочи:

мкг/24 ч = мкг/л × л/24 ч

Преобразование:

1 нг/мл = 1 мкг/л

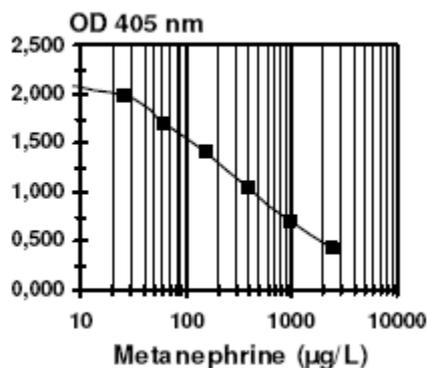
Метанефрин (мкг/л) × 5.07 × 10⁻³ = мкМ/л

Типичный пример калибровочной кривой

Типичная кривая, полученная с использованием данного набора.

(Пример. Не использовать для расчетов!)

Стандарт	Метанефрин, мкг/л	Средняя ОП	ОП/ОП макс (%)
A	0.0	2.220	100.0
B	26	1.987	90.0
C	64	1.707	77
D	160	1.393	63
E	400	1.048	47
F	1000	0.702	32
G	2500	0.427	19



14. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Результаты анализа не могут сами по себе являться основанием для каких-либо терапевтических заключений. Они должны соответствовать клинической картине и другим лабораторным тестам.

Для практически здоровых людей были получены следующие результаты:

Среднее: 134 мкг/день, диапазон: 25 – 312 мкг/день (97.5 % процентиль)

Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно установить диапазон нормальных значений.

15. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Сбор образцов существенно влияет на результаты тестирования. Подробно процедура сбора и хранения образцов описана в разделе «Сбор и хранение образцов».

Данные по перекрестной реактивности приведены в разделе «Характеристики метода»

16. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Аналитическая специфичность (Перекрестная реактивность)	Аналит		Перекрестная реактивность (%)	Перекрестная реактивность других протестированных веществ составила < 0.01 %
	адреналин		0.327	
	норметанефрин		0.151	
	кофейная кислота		0.004	
Аналитическая чувствительность (предел определения)	8.6 мкг/л		Среднее значение нулевого стандарта - 2SD	
Воспроизводимость	Диапазон (мкг/л)	CV (%)		
Внутри серии	79.6 -363	8.3 – 9.6		
Между сериями	94.4 -1650	8.1 – 9.3		
Линейность	Диапазон (мкг/л)	Серийное	Диапазон (%)	

	94.6 -6327	До 1:64	85 -117
Извлечение	Среднее (%)	Диапазон (%)	% извлечения после обогащения
	102	85 -114	
Сравнение с методом ГХМС	ГХМС = 1.04 x метод IBL -12.5		r = 0.88; n = 43
Сравнение ручного и автоматизированного выполнения данного метода	Ручная постановка = 0,97 Triturus + 0.380		r = 0.99; n = 56



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
www.diameb.com