

НАБОР ИФА
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СВОБОДНОГО МЕТАНЕФРИНА И НОРМЕТАНЕФРИНА В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПЛАЗМЕ

RE59202, MetCombi ELISA

Каталог. № : **RE59202**
Количество : **96**
Производитель: **IBL (Германия)**

Методика от 11-2014



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

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Иммуноферментный набор предназначен для количественного определения свободного метанефрина и норметанефрина в человеческой плазме.

2. ВВЕДЕНИЕ

Катехоламины адреналин, норадреналин и дофамин синтезируются мозговым веществом надпочечников, в симпатической нервной системе и в мозге. Они значительно влияют на все ткани организма, регулируя функции как гормональной, так и нервной систем в разнообразных физиологических процессах.

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, а также наблюдение за развитием опухолей нервной системы. Эти соединения применяют главным образом при феохромоцитоме, а также нейробластомах и ганглионевромах.

В 10% случаев феохромоцитомой наблюдается злокачественное перерождение опухоли. Кроме того, повышение уровня катехоламинов и их метаболитов метанефрина и норметанефрина можно наблюдать при карциноиде.

Результаты исследований, проведенных в последние годы показали, что уровни метанефринов в плазме являются лучшими маркерами для диагностики и мониторинга феохромоцитомы.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

После преципитации белка и ацилирования уровни метанефринов измеряют методом ИФА (ELISA). Метод определения основан на принципе конкурентного ИФА, при котором биотинилированные и несвязанные с биотином антигены конкурируют за ограниченное количество сайтов связывания антител. Количество биотинилированных антигенов, связавшихся с антителами, будет обратно пропорционально аналитической концентрации антигенов в образцах. Когда система приходит к равновесию, несвязавшиеся биотинилированные антигены удаляют промыванием, а количество антител, связавшихся с биотинилированными антигенами, определяют с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза. В качестве субстрата используют ТМВ. Количественное содержание в исследуемых образцах оценивают, сравнивая ферментативную активность образца с калибровочной кривой, построенной с помощью поставляемых в набор стандартов.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор – только для *диагностики in vitro*. Для использования профессионалами.
2. Перед постановкой анализа внимательно прочитайте всю инструкцию. Проведите сверку, чтобы вложенная версия и перевод инструкции полностью совпадали. Не начинайте анализ, если у вас возникают вопросы по методике.
3. В случае повреждения упаковки набора, не вскрывайте набор и свяжитесь с компанией IBL в течение одной недели после получения заказа. Заявки по поводу повреждения упаковки должны быть направлены в письменном виде.
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 защитной маске (лабораторных очках).
6. Некоторые компоненты набора содержат компоненты, которые могут вызвать раздражение кожи и слизистой. Избегайте прямого контакта. Более подробная информация о составе реагентов приводится на этикетках. Сведения о безопасности материалов приводятся на домашней страничке сайта IBL.
7. Реагенты этого набора и их производные должны утилизироваться в соответствии с нормами химической и биологической безопасности, принятыми в РФ.
8. Избегайте контакта со стоп-раствором, он может вызвать раздражение кожи и химические ожоги.
9. Все реагенты набора, содержащие компоненты человеческого происхождения (сыворотку или плазму), были протестированы на ВИЧ I/II, HBsAg и HCV и дали отрицательный результат. Так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия каких-либо инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

5. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ


Данный набор реагентов при транспортировке не требует соблюдения особого температурного режима. Полученный набор нужно хранить при 2-8 °С. Предохранять от 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 °С.

6. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ




In vivo высвобождение катехоламина и метанефринов зависит от употребления целого ряда продуктов питания и лекарств. Следующие продукты питания и лекарственные препараты (витамин В, бананы, кофе, α-метилдопа, ингибиторы MAO и COMT, препараты, применяемые при гипертензии) нельзя употреблять минимум за 72 часа до взятия образца.

Плазма (ЭДТА)

	Образцы крови должны храниться при 2-8 °С с момента взятия и до центрифугирования для отделения плазмы, не позднее чем через 2 часа после сбора образцов.			
При взятии крови из вены соблюдайте все необходимые меры предосторожности, избегайте химического загрязнения образцов, с момента забора крови и до начала анализа. Не используйте сильно гемолизированные, желтушные или липемичные образцы.				
Хранение:	2-8 °С	< -20 °С (Аликвоты)	≤ -70 °С (Аликвоты)	Предохранять от прямых солнечных лучей и нагревания. Избегать повторных циклов оттаивания-замораживания.
Стабильность:	24 часа	3 месяца	1 год	

7. СОСТАВ НАБОРА

		Реагентов, поставляемых в данном наборе, достаточно для выполнения 96 экстракций в одиночной постановке: 88 образцов, 6 стандартов и 2 контроля. В случае постановки в дублях реагентов достаточно для: 40 образцов, 6 стандартов и 2 контроля. Дополнительные реагенты могут быть заказаны отдельно.
1 x 12 x 8	MTP MN	Микротитровальная пластина Метанефрина, (синего цвета) Разделяемые полоски. Покрытие: Метанефрин.
1 x 12 x 8	MTP NMN	Микротитровальная пластина Нормметанефрина, (желтого цвета) Разделяемые полоски. Покрытие: Нормметанефрин.
2 x 1.5 мл	CAL A, LYO	Стандарт А , лиофилизированный 0 пг/мл, содержит человеческую плазму
1 x 5 x 1.5 мл	CAL B-F, LYO	Стандарты B-F , лиофилизированные Точные концентрации указаны на этикетках флаконов или QC сертификате. Содержат человеческую плазму.
1 x 2 x 1.5 мл	CONTROL 1+2 LYO	Контроли 1 и 2 , лиофилизированные Точные концентрации/диапазоны указаны в QC сертификате. Содержат человеческую плазму.
1 x 2 x 3.5 мл	PREC REAG 1+2	Реагент для преципитации 1 + 2 Готов к использованию.
3 x 2.5 мл	ACYL REAG LYO	Ацилирующий Реагент , лиофилизированный
1 x 450 мкл	ANTISERUM MN CONC	Концентрат (10x) Антисыворотки к Метанефрину Синего цвета. Содержит: Антисыворотка (кролик).
1 x 4 мл	ANTISERUM NMN	Антисыворотка к Нормметанефрину Желтого цвета. Готова к использованию. Содержит: Антисыворотка (кролик).
2 x 13 мкл	ENZCONJ	Ферментный Конъюгат Готов к использованию. Содержит конъюгат анти-кроличьих IgG POD.
2 x 5.5 мл	SOLVENT	Растворитель Готов к использованию. Содержит ацетон.
1 x 6 мл	ACYL BUF	Буфер для ацилирования Готов к использованию. Содержит Tris-HCl буфер
1 x 100	PREC TUBES	Пробирки для осаждения
2 x 20 мл	WASHBUF CONC	Промывочный Буфер, Концентрат (50x)
2 x 13 мл	TMB SUBS	Раствор Субстрата ТМБ Готов к использованию. Содержит ТМБ, H ₂ O ₂ .
2 x 13 мл	TMB STOP	Стоп-раствор Готов к использованию. Содержит 0.3 M H ₂ SO ₄ .
4 шт.	FOIL	Адгезивные пленки для заклеивания стрипов

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

1. Пипетки для дозирования растворов по 20; 25; 50; 100; и 200 мкл, обеспечивающие дозирование с погрешностью менее 3%.
2. Дуплекс DSX Процессор и DSX пробирки (автоматизированная версия).
3. Центрифуга ≥ 4000 x g
4. Орбитальный шейкер (400-600 rpm)
5. Вортекс
6. 8-канальный микродозатор с емкостью для реагентов
7. Автоматическое или полуавтоматическое промывочное устройство, емкость для промывочного буфера
8. Фотометр для микропланшетов (ELISA ридер) с фильтром на 450 нм (и референсным фильтром 600-650 нм)
9. Бидистиллированная или деионизированная вода
10. Бумажные салфетки, одноразовые наконечники, таймер

9. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПОВОДУ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА



1. Неправильное использование образцов 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 нарушений. Убедитесь, что все материалы, реагенты и инструменты готовы для постановки. Выньте реагенты из холодильника и дайте им нагреться до комнатной температуры (18-25 °С), каждый флакон с реагентом необходимо аккуратно встряхнуть перед использованием. Смешивайте 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 сверяйтесь со схемой планшета, где вы указано расположение лунок с 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 периодами. Для внесения растворов в лунки рекомендуется использовать 8-канальный дозатор.
7. Процедура промывки 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 стадиями инкубации. 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 также отражается на качестве анализа. Не открывайте пакет, если он не приобрел комнатную температуру. Неиспользуемые стрипы требуется немедленно запаковать в пакет с влагопоглотителем.

10. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ К АНАЛИЗУ



Этот иммуноферментный анализ предназначен для ручного использования и особенно для автоматизированного использования с процессором Duplex DSX ELISA для определения метанефрина и норметанефрина в плазме.

Таким образом, руководство содержит различные рабочие процедуры.


	Содержимое набора для каждых 96 определений можно разделить для проведения трех независимых постановок. Указанные ниже объемы рассчитаны на одну процедуру анализа с 2 x 6 стрипами (2 x 48 определений) метанефрина и норметанефрина.
	Дополнительные Реагент и Растворитель можно заказать отдельно от IBL под Кат. № ACYL REAG: KEWP 751 или Кат. № Растворитель: KEWP 551.


10.1. Подготовка лиофилизированных и концентрированных реагентов

Растворить/ Развести	Компонент	с	Разбавитель	Примечания	Хранение	Стабильность
6 флаконов	Стандарты А-Ф	1.5 мл	Бидистиллированная вода	Перемешать все флаконы на вортексе и смешивать 20 минут на роликовом миксере		До истечения срока годности. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.
2 флакона	Контроли 1+2					
20 мл	Буфер для промывок	Добавить 1000 мл	Бидистиллированная вода	Соотношение: 1:50 Если необходимо, нагреть до 37 °С для растворения кристаллов	2-8 °С	4 недели
200 мкл	Антисыворотка MN	1800 мкл	Бидистиллированная вода	Соотношение: 1:10 Перемешать осторожно	18-25 °С	1 день

	Ацилирующий реагент: Подготовить свежим и использовать только один раз.					
	Пожалуйста, обратите внимание, что растворитель реагирует со многими пластиковыми материалами, включая пластиковые лотки; Растворитель не реагирует с нормальными наконечниками для пипеток и со стеклянными приборами. Растворитель является нестабильным веществом и растворенный ацилирующий реагент быстро испаряется. Поэтому, не используйте лоток с большой поверхностью вместе с многоканальной пипеткой для внесения ацилирующего реагента.					
Растворить/ Развести	Компонент	с	Разбавитель	Примечания	Хранение	Стабильность
1 флакон	Ацилирующий реагент	2.5 мл	Растворитель	Перемешать в течение 15 минут на роликовом миксере	18-25 °С	3 часа


10.2. Подготовка образцов в пробирках для преципитации

	Примечание к автоматической процедуре: Для подготовки к автоматизированной версии пипетировать 200 мкл стандартов и контролей в 1.8 мл DSX пробирки. Используйте преципитационные пробирки, поставляемые в наборе, только для образцов.
-------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	Разведение образцов: Образцы, предположительно содержащие более высокие концентрации, чем на самом высоком уровне, должны быть разбавлены перед шагом осаждения со стандартом А.
-------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

1.	Пометить Преципитационные Пробирки и внести по 200 мкл каждого Стандарта, Контроля и образца в соответствующие пробирки.
2.	Внести по 25 мкл реагента для преципитации 1 в каждую пробирку.
3.	Внести по 25 мкл реагента для преципитации 2 в каждую пробирку и перемешать на вортексе (5-10 секунд).
4.	Центрифугировать Преципитационные Пробирки 15 минут при $\geq 4000 \times g$.
5.	Пипетировать 50 мкл Ацилирующего Буфера в каждую пробирку.
6.	Использовать мультиканальные пипетки Еррендорф (или аналогичное устройство), заполнить шприц непосредственно из флакона с растворенным Ацилирующим реагентом и заполнить лунку за лункой.
7.	Пипетировать 40 мкл свежеприготовленного Ацилирующего Реагента в каждую пробирку. Перемешать на вортексе каждую пробирку сразу же после пипетирования (2-4 секунды). В ресуспендировании гранул нет необходимости.
8.	Центрифугировать Преципитационные Пробирки 15 минут при $\geq 4000 \times g$.

11. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

	Указанная процедура выполняется в микропланшете. Синий микропланшет для измерения метанефрина. Желтый - для измерения норметанефрина.
-------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

11.1. Ручная процедура – короткая версия

11.1.1. Ручная процедура – короткая версия для определения Метанефрина (синий микропланшет)

1.	Внести по 50 мкл каждого ацилированного Стандарта, Контроля и Образца пациента в соответствующие лунки микропланшета. Не накрывать планшет.
2.	Инкубировать 60 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
3.	Внести по 25 мкл разбавленной Антисыворотки Метанефрина в каждую лунку. Цвет изменится на синий.
4.	Накрыть планшет адгезивной пленкой. Инкубировать 120 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
5.	Удалить адгезивную пленку. Удалить инкубационный раствор. Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 4 x 300 мкл. В конце промывки удалить остатки буфера для промывок, постукав перевернутым планшетом по листу фильтровальной бумаги.
6.	Добавить в каждую лунку по 100 мкл Ферментного Конъюгата. Накрыть планшет адгезивной пленкой.

7.	Инкубировать 30 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
8.	Удалить адгезивную пленку. Удалить инкубационный раствор. Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 4 x 300 мкл . В конце промывки удалить остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по листу фильтровальной бумаги.
9.	Для добавления растворов субстрата и стоп-реагента используйте, если это возможно, 8 - канальную пипетку. Добавление растворов субстрата и стоп-реагента необходимо проводить через одинаковые промежутки времени.
10.	Внести в каждую лунку по 100 мкл Субстратного Раствора ТМБ .
11.	Инкубируйте в течение 25-35 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
12.	!!! Реакция с субстратом чувствительна к изменению времени и температуры. Избегайте нагревания и попадания прямых солнечных лучей.
13.	Остановить реакцию добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-раствора ТМБ . Перемешать содержимое лунок, аккуратно встряхивая микропланшет. Окрашивание сменится с синего на желтое.
14.	Измерить в лунках оптическую плотность (ОП) при 450 нм на микропланшетном фотометре (длина волны сравнения 600-650 нм) не позднее чем через 15 минут после добавления стоп-раствора.

11.1.2. Ручная процедура – короткая версия для определения Норметанефрина (желтый микропланшет)

1.	Внести по 50 мкл каждого ацилированного Стандарта, Контроля и Образца пациента в соответствующие лунки микропланшета. Не накрывать планшет.
2.	Инкубировать 60 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
3.	Внести по 25 мкл разбавленной Антисыворотки Норметанефрина в каждую лунку. Цвет изменится на оранжевый.
4.	Накрыть планшет адгезивной пленкой. Инкубировать 120 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
5.	Удалить адгезивную пленку. Удалить инкубационный раствор. Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 4 x 300 мкл . В конце промывки удалить остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по листу фильтровальной бумаги.
6.	Добавить в каждую лунку по 100 мкл Ферментного Конъюгата . Накрыть планшет адгезивной пленкой.
7.	Инкубировать 30 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
8.	Удалить адгезивную пленку. Удалить инкубационный раствор. Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 4 x 300 мкл . В конце промывки удалить остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по листу фильтровальной бумаги.
9.	Для добавления растворов субстрата и стоп-реагента используйте, если это возможно, 8 - канальную пипетку. Добавление растворов субстрата и стоп-реагента необходимо проводить через одинаковые промежутки времени.
10.	Внести в каждую лунку по 100 мкл Субстратного Раствора ТМБ .
11.	Инкубируйте в течение 25-35 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
12.	!!! Реакция с субстратом чувствительна к изменению времени и температуры. Избегайте нагревания и попадания прямых солнечных лучей.
13.	Остановить реакцию добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-раствора ТМБ . Перемешать содержимое лунок, аккуратно встряхивая микропланшет. Окрашивание сменится с синего на желтое.
14.	Измерить в лунках оптическую плотность (ОП) при 450 нм на микропланшетном фотометре (длина волны сравнения 600-650 нм) не позднее чем через 15 минут после добавления стоп-раствора.

11.2. Альтернативная версия с инкубацией в течение ночи

11.2.1. Первый день: Ручная процедура для определения Метанефрина (синий микропланшет)

1.	Внести по 50 мкл каждого ацилированного Стандарта, Контроля и Образца пациента в соответствующие лунки микропланшета. Не накрывать планшет.
2.	Инкубировать 60 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
3.	Накрыть планшет адгезивной пленкой. Инкубировать в течение ночи (12-20 часов) при температуре 2-8 °С.

11.2.2. Первый день: Ручная процедура для определения Норметанефрина (желтый микропланшет)

1.	Внести по 50 мкл каждого ацилированного Стандарта, Контроля и Образца пациента в соответствующие лунки микропланшета. Не накрывать планшет.
2.	Инкубировать 60 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
3.	Накрыть планшет адгезивной пленкой. Инкубировать в течение ночи (12-20 часов) при температуре 2-8 °С.

11.2.3. Второй день: Ручная процедура для определения Метанефрина (синий микропланшет)

1.	Удалить адгезивную пленку. Внести по 25 мкл разбавленной Антисыворотки Метанефрина в каждую лунку. Цвет изменится на синий.
2.	Накрыть планшет адгезивной пленкой. Инкубировать 120 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
3.	Удалить адгезивную пленку. Удалить инкубационный раствор. Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 4 x 300 мкл . В конце промывки удалить остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по листу фильтровальной бумаги.
4.	Добавить в каждую лунку по 100 мкл Ферментного Конъюгата . Накрыть планшет адгезивной пленкой.
5.	Инкубировать 30 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
6.	Удалить адгезивную пленку. Удалить инкубационный раствор. Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 4 x 300 мкл . В конце промывки удалить остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по листу фильтровальной бумаги.
7.	Для добавления растворов субстрата и стоп-реагента используйте, если это возможно, 8 - канальную пипетку. Добавление растворов субстрата и стоп-реагента необходимо проводить через одинаковые промежутки времени.
8.	Внести в каждую лунку по 100 мкл Субстратного Раствора ТМБ .
9.	Инкубируйте в течение 25-35 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
10.	!!! Реакция с субстратом чувствительна к изменению времени и температуры. Избегайте нагревания и попадания прямых солнечных лучей.
11.	Остановить реакцию добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-раствора ТМБ . Перемешать содержимое лунок, аккуратно встряхивая микропланшет. Окрашивание сменится с синего на желтое.
12.	Измерить в лунках оптическую плотность (ОП) при 450 нм на микропланшетном фотометре (длина волны сравнения 600-650 нм) не позднее чем через 15 минут после добавления стоп-раствора.

11.2.4. Второй день: Ручная процедура для определения Норметанефрина (желтый микропланшет)

1.	Удалить адгезивную пленку. Внести по 25 мкл разбавленной Антисыворотки Норметанефрина в каждую лунку. Цвет изменится на оранжевый.
2.	Накрыть планшет адгезивной пленкой. Инкубировать 120 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
3.	Удалить адгезивную пленку. Удалить инкубационный раствор. Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 4 x 300 мкл . В конце промывки удалить остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по листу фильтровальной бумаги.
4.	Добавить в каждую лунку по 100 мкл Ферментного Конъюгата . Накрыть планшет адгезивной пленкой.
5.	Инкубировать 30 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
6.	Удалить адгезивную пленку. Удалить инкубационный раствор. Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 4 x 300 мкл . В конце промывки удалить остатки буфера для промывок, постучав перевернутым планшетом по листу фильтровальной бумаги.
7.	Для добавления растворов субстрата и стоп-реагента используйте, если это возможно, 8 - канальную пипетку. Добавление растворов субстрата и стоп-реагента необходимо проводить через одинаковые промежутки времени.
8.	Внести в каждую лунку по 100 мкл Субстратного Раствора ТМБ .
9.	Инкубируйте в течение 25-35 минут при комнатной температуре (18-25 °С) на орбитальном шейкере (500 об/мин).
10.	!!! Реакция с субстратом чувствительна к изменению времени и температуры. Избегайте нагревания и попадания прямых солнечных лучей.
11.	Остановить реакцию добавлением во все лунки по 100 мкл стоп-раствора ТМБ . Перемешать содержимое лунок, аккуратно встряхивая микропланшет. Окрашивание сменится с синего на желтое.
12.	Измерить в лунках оптическую плотность (ОП) при 450 нм на микропланшетном фотометре (длина волны сравнения 600-650 нм) не позднее чем через 15 минут после добавления стоп-раствора.

11.3. Автоматизированная процедура

11.3.1. Автоматизированная процедура для определения Метанефрина (синий микропланшет)

1.	Внести по 50 мкл каждого ацилированного Стандарта, Контроля и Образца пациента в соответствующие лунки микропланшета.
2.	Инкубировать 3 минуты (макс. 5 минут) при температуре 30 °С на орбитальном шейкере (встряхивание на средней скорости).
3.	Инкубировать 60 минут (макс. 70 минут) при КТ (комнатной температуре).
4.	Внести по 25 мкл разбавленной Антисыворотки Метанефрина в каждую лунку.
5.	Инкубировать 120 минут (макс. 130 минут) при КТ на орбитальном шейкере (встряхивание на средней скорости).
6.	Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 5 x 300 мкл . Удалить остатки раствора.
7.	Добавить в каждую лунку по 100 мкл Ферментного Конъюгата .
8.	Инкубировать 30 минут (макс. 32 минуты) при КТ на орбитальном шейкере (встряхивание на средней скорости).
9.	Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 5 x 300 мкл . Удалить остатки раствора.
10.	Внести в каждую лунку по 100 мкл Субстратного Раствора ТМБ .
11.	Инкубировать 20 минут (макс. 25 минут) при КТ на орбитальном шейкере (встряхивание на средней скорости).
12.	Пипетировать по 100 мкл стоп-раствора ТМБ во все лунки.
13.	Измерить оптическую плотность при 450 нм (длина волны сравнения 620 нм).

11.3.2. Автоматизированная процедура для определения Норметанефрина (желтый микропланшет)

1.	Внести по 50 мкл каждого ацилированного Стандарта, Контроля и Образца пациента в соответствующие лунки микропланшета.
2.	Инкубировать 3 минуты (макс. 5 минут) при температуре 30 °С на орбитальном шейкере (встряхивание на средней скорости).
3.	Инкубировать 60 минут (макс. 70 минут) при КТ (комнатной температуре).
4.	Внести по 25 мкл разбавленной Антисыворотки Норметанефрина в каждую лунку.
5.	Инкубировать 120 минут (макс. 130 минут) при КТ на орбитальном шейкере (встряхивание на средней скорости).
6.	Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 5 x 300 мкл . Удалить остатки раствора.
7.	Добавить в каждую лунку по 100 мкл Ферментного Конъюгата .
8.	Инкубировать 30 минут (макс. 32 минуты) при КТ на орбитальном шейкере (встряхивание на средней скорости).
9.	Промыть планшет разбавленным Буфером для Промывок 5 x 300 мкл . Удалить остатки раствора.
10.	Внести в каждую лунку по 100 мкл Субстратного Раствора ТМБ .
11.	Инкубировать 20 минут (макс. 25 минут) при КТ на орбитальном шейкере (встряхивание на средней скорости).
12.	Пипетировать по 100 мкл стоп-раствора ТМБ во все лунки.
13.	Измерить оптическую плотность при 450 нм (длина волны сравнения 620 нм).

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 всех стандартов, входящих в состав набора, должны лежать в диапазонах допустимых значений, указанных в сертификате контроля качества (QC).

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.

13. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

Концентрация анализа в образцах может быть рассчитана из калибровочной кривой.

Если образцы были разведены дополнительно, то необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения.

Преобразование:

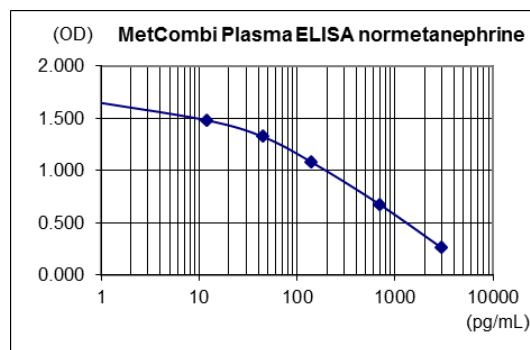
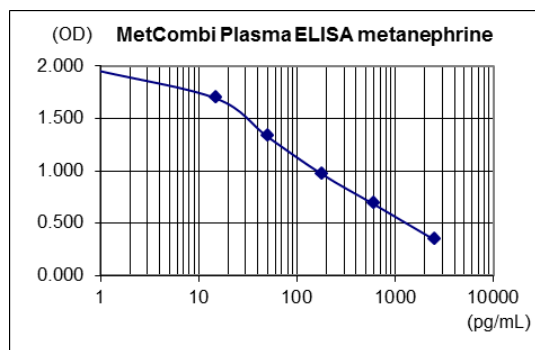
Метанефрин (пг/мл) x 5.07 = пмоль/л

норметанефрин (пг/мл) x 5.46 = пмоль/л

Типичный пример калибровочной кривой

(Пример. Не использовать для расчетов!)

Стандарт	Метанефрин (пг/мл)	Средняя ОП	Стандарт	Норметанефрин (пг/мл)	Средняя ОП
A	0	1.724	A	0	1.654
B	15	1.475	B	12	1.481
C	50	1.284	C	45	1.322
D	180	0.947	D	140	1.081
E	600	0.602	E	700	0.674
F	2500	0.288	F	3000	0.258



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: (2.5-97.5 % процентиль)

	Плазма		Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала самостоятельно диапазон нормальных значений.
	(пг/мл)	(нмоль/л)	
Метанефрин	< 90	< 0.459	
Норметанефрин	< 190	< 1.037	

15. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Неправильное взятие образцов может существенно повлиять на качество результатов. См. раздел «СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ».

16. ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

См. инструкцию на англ. языке.



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