

# Metanephrine Plasma ELISA (EIA-4313)

## 1. ВВЕДЕНИЕ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Сначала проводится осаждение белков плазмы, затем производится количественное ацилирование метанефрина (метадреналина). Тест Метанефрин плазмы ИФА представляет собой твердофазный конкурентный метод иммуоферментного анализа. Метанефрин иммобилизован на поверхности лунок планшета (твердой фазе). Ацилированный метанефрин, содержащийся в стандартах, контролях и исследуемых образцах, и иммобилизованный на твердой фазе метанефрин конкурируют за ограниченное число центров связывания специфических антител. Когда система достигнет равновесия, несвязавшийся антиген и несвязавшиеся комплексы антиген-антитело удаляются промывкой. Антитела, связавшиеся с метанефрином, иммобилизованным на твердой фазе, выявляют конъюгатом антикроличьих IgG с пероксидазой. В качестве субстрата используется ТМБ. Интенсивность реакции измеряют при длине волны 450 нм. Количество метанефрина в исследуемых образцах рассчитывается по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям стандартов.

⚠ Используемая в данном наборе антисыворотка распознает только биологически активные L-формы метанефрина. Имеющиеся коммерческие синтетические норметанефрин или метанефрин всегда представляют собой смесь D- и L-форм. Соотношение между двумя формами различно в разных партиях препаратов. Это обстоятельство имеет важное значение в тех случаях, когда синтетический метанефрин используется для обогащения нативных образцов! Так как с помощью данного набора будет обнаруживаться только около 50% синтетического метанефрина (т.е. L-форма), все образцы будут недоопределяться, в сравнении с данными ВЭЖХ! Поэтому следует использовать только нативные образцы.

## 2. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2 – 8 °С до конца срока годности. Не используйте компоненты набора по истечении срока годности, указанного на этикетке.

## 3. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Уравнивающий реагент	2×10 мл	лиофилизирован
Реакционные пробирки	2×50	готовы к использованию
Стандарт А (М – 0 пг/мл)	1×20 мл	готов к использованию
Стандарт В (М – 15 пг/мл)	1×1 мл	готов к использованию
Стандарт С (М – 50 пг/мл)	1×1 мл	готов к использованию
Стандарт D (М – 150 пг/мл)	1×1 мл	готов к использованию
Стандарт E (М – 500 пг/мл)	1×1 мл	готов к использованию
Стандарт F (М – 3000 пг/мл)	1×1 мл	готов к использованию
Концентрат ацилирующего реагента	1×1,5	концентрат
Контроль 1	1×1 мл	готов к использованию
Контроль 2	1×1 мл	готов к использованию
Концентрат промывочного буфера	1×20 мл	Концентрат. Разведите содержимое флакона дистиллированной водой до конечного объема 500 мл
Ферментный конъюгат	1×11 мл	готов к использованию, конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgG кролика
Субстрат	1×11 мл	готов к использованию, содержит ТМБ
Стоп раствор	1×11	мл готов к использованию, содержит 0,25 М серную кислоту
Пленка для заклеивания стрипов	1×4 шт.	готова к использованию
Планшет с иммобилизованным адреналином – метанефрином	1×96 лунок	12 стрипов 8-луночных (разделяемых на отдельные лунки), синего цвета
Антисыворотка к Метанефрину	1×6 мл	Кроличья, готовая к использованию, синего цвета, синяя крышка
Буфер анализа	1×11 мл	готов к использованию

## 4. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Откалиброванные автоматические пипетки различной точности (например, 10-100 мкл/100-1.000 мкл)
- Устройство для промывки планшет
- Планшетный спектрофотометр, измеряющий оптическую плотность при длинах волн: 450 и 620-650 нм
- Центрифуга, дающая не менее 3000xg
- Орбитальный шейкер (со скоростью около 600 об/мин; амплитуда встряхивания 3 мм)
- Абсорбирующий материал (фильтровальная бумага, бумажные полотенца)
- Дистиллированная вода
- Вортекс

## 5. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

### Плазма

Необходимо использовать плазму с ЭДТА или цитратом в качестве антикоагулянта. Не используйте гемолизированные и особенно жирные образцы. Хранение: не более 6 часов при температуре 2 – 8 °С, не более 6 месяцев при температуре – 20 °С. Избегайте повторного замораживания и оттаивания образцов.

## 6. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед использованием дайте всем реагентам прогреться до комнатной температуры и тщательно перемешайте, аккуратно переворачивая. Промаркируйте нужное количество Реакционных пробирок. Рекомендуется постановка анализа в дублях.

### 6.1. Приготовление реагентов

#### Промывочный буфер

Разведите 20 мл Концентрата промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 500 мл. Храните разведенный буфер при температуре 2 – 8 °С, годен до окончания срока годности (указан в наборе).

#### Уравнивающий реагент

Восстановите Уравнивающий реагент 10 мл дистиллированной воды. Восстановленный Уравнивающий реагент, не использованный сразу после восстановления, должен быть разбит на аликвоты и храниться при -20 °С. Разморожен он может быть только один раз.

#### Ацилирующий реагент

Добавьте 80 мкл Концентрата ацилирующего реагента к 3 мл дистиллированной воды и тщательно перемешайте. Используйте немедленно!



**Ацилирующий реагент стабилен не более 3 минут.**

Пересмотрено 29.02.2009

**6.2. Осаждение**

1. Внесите в соответствующие **Реакционные пробирки** по **100 мкл стандартов, 100 мкл контролей** и **250 мкл образцов** плазмы.
2. Внесите во все пробирки со стандартами и контролями по **250 мкл Уравнивающего реагента**.
3. Внесите во все пробирки с плазмой пациентов по **50 мкл Стандарта А**.
4. Центрифугируйте в течение **15 минут при 3000 × g**.



**Отберите по 75 мкл каждого супернатанта для ацилирования.**

**6.3. Метанефрин**

1. Внесите во все лунки стрипов с Метанефрином по **50 мкл Корректирующего буфера**.
2. Внесите по **75мкл** каждого **супернатанта от контролей, стандартов и образцов** в соответствующие лунки
3. Внесите по **25 мкл Ацилирующего реагента** (см. 6.1.) во все лунки.



**Ацилирующий реагент стабилен не более 3 минут.**

4. Инкубируйте в течение **15 минут** при **комнатной температуре (20-25°C)** на орбитальном шейкере (около 600 об/мин).
5. Внесите во все лунки по **50 мкл Антисыворотки к метанефрину**.
6. Закройте планшет **Пленкой** и инкубируйте **15-20 часов (в течение ночи)** при температуре **2 – 8°C**.
7. Снимите пленку, удалите содержимое лунок и тщательно **промойте 4 раза**, добавляя по **300 мкл** разведенного **Промывочного буфера** в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
8. Внесите во все лунки по **100 мкл Конъюгата фермента**.
9. Инкубируйте в течение **30 минут** при **комнатной температуре (20-25°C)** на орбитальном шейкере (около 600 об/мин).
10. Удалите содержимое лунок и тщательно **промойте 4 раза**, добавляя по **300 мкл** разведенного **Промывочного буфера** в каждую лунку. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
11. Внесите во все лунки по **100 мкл Субстрата**, инкубируйте в течение **20 - 30 минут** при **комнатной температуре (20-25°C)** на орбитальном шейкере (около 600 об/мин).



**Избегайте воздействия прямых солнечных лучей!**

12. Добавьте во все лунки по **100 мкл Стоп-раствора** и встряхните планшет для обеспечения гомогенного распределения раствора.
13. **Измерьте** оптическую плотность раствора не позже, чем через 10 минут с помощью планшетного спектрофотометра при длине волны **450 нм** и сравнительной длине волны между 620 нм и 650 нм.

**7. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Стандарт	Концентрации стандартов					
	A	B	C	D	E	F
Метанефрин (пг/мл)	0	30	100	300	1000	3000
Метанефрин (пмоль/л)	0	152	507	1521	5070	15210
Пересчет	Метанефрин (пг/мл) × 5,07 = Метанефрин (пмоль/л)					

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого стандарта, контроля или исследуемого образца. На миллиметровой бумаге постройте калибровочную кривую зависимости средней оптической плотности стандартов (по оси Y) от  $\log$  концентрации метанефрина в стандартах в пг/мл (по оси X). Для построения кривой можно использовать различные типы нелинейной регрессии (напр., сплайн, 4х парам. логистику, Акима).

По калибровочной кривой определите концентрации метанефрина в контролях и исследуемых образцах, сопоставляя значения их средней оптической плотности с соответствующими концентрациями аналита.

**7.1. Контроль качества**

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормативами. Используйте контроли как с нормальными, так и с патологическими уровнями. Концентрации контролей набора и других коммерческих контролей не должны выходить за рамки доверительных интервалов. Доверительные интервалы контролей в листе контроля качества (QC Report).

**7.2. Калибровка**

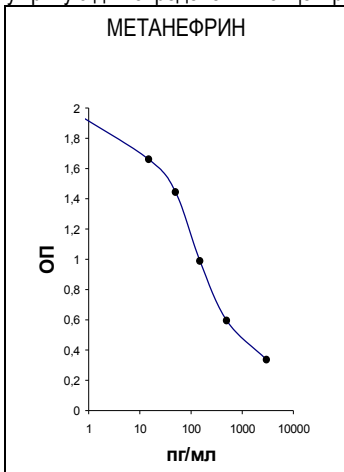
Связывание антисывороток и конъюгатов фермента, а также активность использованного фермента термозависимы, поэтому значения оптических плотностей могут изменяться, если не используется термостат. Чем выше температура, тем будут выше значения оптических плотностей. Сходные колебания связаны с изменением времени инкубации. Оптимальная температура при иммуноферментном анализе 20 – 25°C.



При превышении максимальных значений оптической плотности, измеряемых прибором при длине волны 450 нм, можно измерить оптическую плотность в лунках не более чем через 10 минут, используя длину волны 405 нм.

**7.3. Типичная калибровочная кривая**

На стр. 5 английского варианта инструкции приводится образец типичной калибровочной кривой набора Метанефрин плазмы ИФА. Пожалуйста, не используйте эту кривую для определения концентрации метанефрина в образцах.



## 8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Ожидаемые значения		<b>Метанефрин</b>
	Плазма	< 90 пг/мл

Чувствительность (Предел обнаружения)		<b>Метанефрин</b>
	Плазма	15 пг/мл

Специфичность (Перекрестная реактивность)	Вещество	Перекрестная реактивность (%)
		Метанефрин
	Дериватизированный метанефрин	100
	Дериватизированный норметанефрин	0.043
	Дериватизированный 3-метокситирамин	0.002
	Адреналин	0.0034
	Норадреналин	< 0.001
	Допамин	< 0.001
	Ванилинминдальная кислота	< 0.001
	Гомованилиновая кислота	< 0.001
	L-Допа	< 0.001
	L-Тирозин	< 0.001
	Тирамин	< 0.001

Воспроизводимость							
Вариабельность в пределах постановки				Вариабельность между постановками,			
	Образец	Интервал (пг/мл)	КВ (%)		Образец	Интервал (пг/мл)	КВ (%)
Метанефрин	1	42 ± 5.6	13	Метанефрин	1	44 ± 6.2	14
	2	77 ± 6.6	8.6		2	84 ± 5.6	6.7
	3	417 ± 6.8	6.8		3	433 ± 36	8.3

Линейность			Интервал	Серийные разведения до	Интервал (%)
	Метанефрин	Плазма	22 – 762 пг/мл	1:32	94 – 124

Открытие			Среднее (%)	Интервал (%)	% Открытие после усиления
	Метанефрин	Плазма	113	108 – 125	

Сравнение метода по РИА	Метанефрин	Плазма	ИФА = 1.1 x РИА – 23.5	r = 0.99; n = 30
-------------------------	------------	--------	------------------------	------------------

## 9. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 9.1 Надежность результатов анализа

Для того чтобы обеспечить надежные результаты анализа, его следует проводить в соответствии с прилагающимися инструкциями, а также с текущими правилами и нормативами (GLP, RILIBÄK и т.д.). Особое внимание следует обращать на контрольные исследования точности и правильности во время проведения анализа; результаты этих контрольных исследований не должны выходить за рамки нормальных диапазонов. В случае значительных расхождений в характеристиках анализа, указанных производителем и реально полученных Вами, пожалуйста, свяжитесь с производителем набора для получения дальнейших инструкций.

## 9.2.Рекламации

В случае рекламации, пожалуйста, прикладывайте письменный отчет, содержащий все данные по проведению анализа, полученным результатам, а также копии оригиналов распечаток. Пожалуйста, свяжитесь с представителем производителя для получения формы рекламации и верните эту форму полностью заполненной производителю.

## 9.3. Гарантии

Набор произведен в соответствии с последними достижениями в технологии и подвергается обязательным внутренним и внешним проверкам контроля качества. Любые изменения в наборе или в процессе постановки анализа, а также использование реагентов непредусмотренного назначения могут отрицательно сказаться на результатах анализа и, таким образом, не подпадают под действие гарантии. Производитель не отвечает за повреждения, произошедшие при транспортировке.

## 9.4 Утилизация отходов

Остатки материалов и/или все остатки реагентов и готовых к использованию растворов являются специальными отходами. Обращение с ними регулируется местными и государственными нормативами. Об удалении специальных отходов имеется информация соответствующих структур органов власти. Утилизация набора должна быть проведена в соответствии с действующими на территории страны нормативами. Законодательной базой утилизации специальных отходов является пакет социально-экономических законов.

Данные по безопасности набора можно производитель может предоставить. Данные по безопасности соответствуют стандарту ISO 11014-1.

## 9.5 Возможные отклонения

Не используйте в одном анализе реагенты и растворы из разных серий набора. Учитывайте разные условия транспортировки и хранения набора. Отступления от инструкции при обработке образцов и работе с набором могут привести к получению искаженных результатов. Не используйте компоненты набора по

**Пересмотрено 29.02.2009**

истечения срока годности. Избегайте микробной контаминации реагентов и промывочного раствора. Соблюдайте указанные в инструкции режимы инкубации и промывки.

**9.6 Меры предосторожности**

Соблюдайте указанные в инструкции режимы инкубации и промывки. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей. Не курите, не ешьте и не пейте в зоне работы с образцами или тестовыми пробирками к набору. При работе с компонентами набора или с образцами всегда используйте одноразовые перчатки, тщательно мойте руки сразу после окончания работы. Избегайте разбрызгивания реагентов и образцов! Избегайте контактов реагентов с кожей, используйте защитные перчатки и одежду.

Все стадии необходимо выполнять согласно протоколу, необходимо точно соблюдать объемы всех реагентов и образцов, указанные в различных разделах инструкции (объемы при отборе пипеткой или в процессе подготовки).

Правильные результаты также зависят от использования поверенных откалиброванных пипеточных дозаторов.

Азид натрия может взаимодействовать свинцом и медью пробирок с образованием взрывчатых соединений, для предотвращения этого необходимо промывать их большим объемом воды.

Все реагенты набора, содержащие человеческую или животную сыворотку или плазму протестированы и имеют подтвержденный отрицательный результат по ВИЧ (I/II), HbsAg, HCV. Тем не менее, все реагенты должны рассматриваться как потенциально инфицированные и соответственно утилизироваться.

**ЛИТЕРАТУРА**

*(См. в оригинале инструкции).*