

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАНЕФРИНА В МОЧЕ

EIA-4315, Metanephrine Urine ELISA

Каталог. № : EIA-4315
 Количество : 96
 Производитель: DRG(США)

Методика от 12-2011
 Версия 7.0



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

1. ВВЕДЕНИЕ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Во время подготовки образцов метанефрин (метадреналин) количественно ацилируется. В наборе применяется твердофазный конкурентный метод иммуноферментного анализа на планшетах. Антиген иммобилизован на поверхности лунок планшета (твердой фазе). Ацилированные калибраторы, контроли и исследуемые образцы, а также иммобилизованный на твердой фазе антиген конкурируют за ограниченное число центров связывания специфичных антител. Когда система достигает равновесия, несвязавшийся антиген и несвязавшиеся комплексы антиген-антитело удаляют 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 антител, связавшихся с метанефрином, иммобилизованным на твердой фазе, вычисляется по стандартной кривой, построенной по калибраторам с известной концентрацией.

2. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при температуре 2 – 8°C в течение всего срока годности. Не используйте компоненты набора по истечении срока годности, указанного на этикетке.

3. СОСТАВ НАБОРА

Стандарт А	1 x 4 мл	Готов к использованию
Стандарт В	1 x 4 мл	Готов к использованию
Стандарт С	1 x 4 мл	Готов к использованию
Стандарт D	1 x 4 мл	Готов к использованию
Стандарт E	1 x 4 мл	Готов к использованию
Стандарт F	1 x 4 мл	Готов к использованию
Ацилирующий концентрат	1 x 0,5 мл	Развести перед использованием
Ацилирующий разбавитель	1 x 4 мл.	Готов к использованию
Соляная кислота, содержит 0,1 М HCl	1 x 30 мл	Готов к использованию
Контроль 1	1 x 4 мл	Готов к использованию
Контроль 2	1 x 4 мл	Готов к использованию
Ацилирующий буфер	1 x 30 мл	Готов к использованию
Реакционные пробирки	2 x 50 шт.	Готовы к использованию
Конъюгат фермента конъюгированные с пероксидазой антикроличьи IgG	1 x 12мл	Готов к использованию
Промывочный буфер, концентрат Развести содержимое дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл	1 x 20 мл	Концентрат
Субстрат содержит ТМБ	1 x 12 мл	Готов к использованию
Стоп-реагент содержит 0,25 М раствор серной кислоты	1 x 12 мл	Готов к использованию
Реакционный микропланшет 12 стрипов с иммобилизованным адреналином-метанефрином, разделяемые на отдельные лунки, покрытые метанефрином (синего цвета)	1 x 96 лунок	Готов к использованию
Антисыворотка к Метанефрину кроличья (синего цвета, с синей закручивающейся крышкой)	1 x 12 мл	Готов к использованию

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

- Автоматические пипетки (10-100 мкл и 100-1000 мкл)
- Устройство для промывки планшетов
- Планшетный фотометр, способный измерять оптическую плотность при длине волны 450 и 620-650 нм
- Центрифуга на 3000 об/мин
- Шейкер (со скоростью встряхивания 600 об/мин; или с орбитой встряхивания 3 мм)
- Впитывающий влагу материал (бумажные полотенца или фильтровальная бумага) для промокания стрипов
- Дистиллированная вода, вортекс
- Водяная баня на 90°C.

5. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Моча

Можно использовать как разовую, так и суточную мочу. Весь объем суточной мочи следует поместить в одну емкость, содержащую 10 – 15 мл 6 М соляной кислоты в качестве консерванта, и перемешать. Образцы мочи можно хранить при температуре минус 20°C до 6 мес. Избегать повторного замораживания и оттаивания. Предохранять от воздействия прямых солнечных лучей.

6. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед использованием все реагенты следует прогреть до комнатной температуры. Рекомендуется проводить анализ в дубликатах.

6.1 Приготовление реагентов

Промывочный буфер

Растворить 20 мл концентрата промывочного буфера в дистиллированной воде до конечного объема 1000 мл, хранить при 2-8 °С до 6 мес.

Ацилирующий раствор

Перед приготовлением ацилирующего раствора убедитесь, что ацилирующий разбавитель достиг комнатной температуры и образовал гомогенный, без кристаллов раствор.

Разведите Ацилирующий концентрат 1 + 60 ацилирующим разбавителем в стеклянной или полипропиленовой емкости.

Ацилирующий концентрат	10 мкл.	20 мкл.	25 мкл.	50 мкл.
Ацилирующий разбавитель	600 мкл.	1.2 мл.	1.5 мл.	3 мл.

!!!! Ацилирующий раствор готовится непосредственно перед анализом (не ранее чем 60 мин. до анализа).

6.2 Подготовка образцов и ацилирование

Гидролиз

1. Внесите по 25 мкл стандартов, контролей и образцов в соответствующие реакционные пробирки.
2. Добавьте 250 мкл соляной кислоты во все пробирки.
3. Закройте пробирки, перемешайте содержимое на вортексе и инкубируйте 30 мин. при 90°С.
4. Дайте пробиркам остыть до комнатной температуры.

При определении только свободного метанефрина п.3-4 можно опустить.

Ацилирование:

5. Внесите во все пробирки по 250 мкл ацилирующего буфера.
6. Внесите во все пробирки по 25 мкл ацилирующего раствора.
7. Тщательно перемешайте на вортексе и инкубируйте 15 минут при комнатной температуре.
8. Добавьте во все пробирки по 2,5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешайте. Отберите по **25 мкл** подготовленных **стандартов, контролей и образцов мочи** для исследования метанефрина в иммуноферментном анализе.

6.3. Иммуноферментный анализ метанефрина

1. Внесите в соответствующие лунки стрипов по 25 мкл ацилированных стандартов, контролей и исследуемых образцов.
2. Внесите во все лунки по 100 мкл **антисыворотки к метанефрину**.
3. Инкубируйте в течение 30 мин. при комнатной температуре (20-25 °С) при встряхивании на орбитальном шейкере (600 об/мин). Или без шейкера: резко смешать содержимое лунок и инкубировать в течение 1 часа при комн. температуре (20-25 °С)
4. Удалите содержимое лунок и тщательно промойте, добавляя по 300 мкл разведенного промывочного буфера в каждую лунку. Повторите промывание 34 раза. Удалите остатки жидкости из лунок, слегка постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.
5. Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата фермента.
6. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °С) при встряхивании на орбитальном шейкере (600 об/мин). Без использования шейкера: инкубируйте 15 мин. При комн.температуре (20-25 °С).
7. Удалите содержимое лунок и тщательно промойте каждую 4 раза, добавляя по 300 мкл разведенного промывочного буфера в каждую лунку. Удалите остатки жидкости из лунок, слегка постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.
8. Внесите во все лунки по 100 мкл субстрата.
9. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °С) при встряхивании на орбитальном шейкере (600 об/мин). Без использования шейкера: инкубируйте 15 мин. При комн.температуре (20-25 °С). *Избегайте воздействия прямых солнечных лучей!*
10. Добавьте во все лунки по 100 мкл стоп-реагента и встряхните планшет для перемешивания субстрата и стоп-реагента.
11. Измерьте оптическую плотность раствора не позже, чем через 10 минут с помощью планшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм и референтной длине волны между 620 нм и 650 нм.

7. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стандарт	Концентрации стандартов					
	A	B	C	D	E	F
Метанефрин (нг/мл)	0	20	60	200	600	2000
Метанефрин (нмоль/л)	0	101	304	1014	3042	10140
Перевод единиц	Метанефрин (нг/мл) × 5,07 = метанефрин (нмоль/л)					

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого стандарта, контроля или исследуемого образца. На миллиметровой бумаге постройте калибровочную кривую зависимости средней оптической плотности стандартов (по линейной оси Y) от log концентрации метанефрина в стандартах в нг/мл (по логарифмической оси X). Используйте нелинейную регрессию для построения калибровочной кривой (сплайн, Акима). По калибровочной кривой рассчитайте 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 метанефрина в контролях DRG и других коммерческих контролях не должны выходить за рамки заданных диапазонов. Заданные диапазоны контролей DRG указаны в листе контроля качества (QC Report).

7.2. Калибровка

Связывание антисывороток и конъюгата 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 и с изменением времени инкубации. Оптимальная температура при иммуноферментном анализе – 20–25оС.

Примечание: 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. Калибровка

На стр. 4 английского варианта инструкции по применению приводится образец типичной калибровочной кривой набора Метанефрин мочи ИФА. Пожалуйста, не используйте эту кривую для определения концентрации метанефрина в образцах.

8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Ожидаемые значения

Референсные значения, приведенные ниже, могут служить только в качестве ориентировочных. Рекомендуется каждой лаборатории выработать собственные значения нормы.

	Метанефрин
Моча	< 350 мкг/день
Чувствительность	
	Метанефрин
Чувствительность	13 нг/мл

Специфичность

Специфичность антисыворотки оценивали, определяя перекрестную реакцию с различными биогенными аминами и их производными. Ниже приведены перекрестные реакции отдельных соединений с антисывороткой к производным метанефрина (использованным в наборе Метанефрин-ИФА).

Метанефрин

Соединение	Перекрестная реакция (%)
Метанефрин	100
Норметанефрин	0,15
3-Метокситирамин	<0,001
Адреналин	3,3
Норадреналин	<0,001
Допамин	<0,001
Ванилин- миндальная кислота	<0,001
Гомованилиновая кислота	<0,001
L-Допа	<0,001
L-Тирозин	<0,001
Тирамин	<0,001

Точность

Точность ИФА оценивали по коэффициенту вариации (КВ) в пределах одной постановки и между постановками, проводя повторные исследования двух образцов мочи с различной концентрацией метанефрина.

Вариативность в пределах постановки,			Вариативность между постановками		
Образец	Среднее ± СО (нг/мл)	КВ (%)	Образец	Среднее ± СО (нг/мл)	КВ (%)
1	69 ± 8,6	12,6	1	102 ± 15,4	7,7
2	446 ± 23	5,2	2	448 ± 40	8,9

Открытие

К образцу мочи добавляли возрастающие количества метанефрина. Исследовали каждый образец с дополнительно внесенным метанефрином. Аналитическое открытие метанефрина оценивали в образцах с 9 различными концентрациями, используя теоретически ожидаемые и практически полученные значения. Среднее значение открытия во всех образцах мочи с различными концентрациями метанефрина составило 98,2% (СО 8%, диапазон 89 – 109%).

Линейность

Линейность ИФА определяли, используя 8 различных разведений образца мочи. Среднее значение линейности во всех разведениях образца мочи составило 100% (СО 12%, диапазон 85,7 – 110,1%). В наборе Метанефрин мочи ИФА соотношение между концентрацией и разведением мочи достоверно не отличалось от заданной линейности при всех исследованных диапазонах концентраций (50 – 1000 нг/мл).

Сравнение с другим методом анализа

Концентрацию метанефрина в 27 образцах мочи определяли набором DRG ИФА (ось X) и методом ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) (ось Y) (образцы для внешнего контроля качества присланы из UK NEQAS). Получены прекрасные результаты по корреляции между методом ИФА и ВЭЖХ. Это означает, что концентрации, измеренные в иммуноферментном анализе, мало отличаются от концентраций, полученных при использовании метода ВЭЖХ на образцах из UK NEQAS. Просим учесть, что значения концентраций контролей из UK NEQAS являются средней величиной, полученной при статистической обработке результатов ВЭЖХ примерно 40 различных пользователей, и в группе всегда есть один патологический образец. По результатам линейно-регрессионного анализа установлены следующие корреляционные характеристики: $y = 0,88x - 0,10$, $r = 0,99$ (см. рис. на стр.7 английского варианта инструкции по применению). Два метода анализа сравнимы.

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, приложите письменный отчет, содержащий все данные по проведению анализа, полученным результатам, а также копии оригиналов распечаток. Пожалуйста, свяжитесь с представителем DRG в Вашем регионе для согласования дальнейших действий.

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 найти на домашней страничке компании DRG. 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 истечении срока годности. Избегайте микробной контаминации реагентов и промывочного раствора. Соблюдайте указанные в инструкции режимы инкубации и промывки.

9.6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Соблюдайте указанные в инструкции режимы инкубации и промывки.
2. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей.
3. Не курите, не ешьте и не пейте в зоне работы с образцами или тестовыми пробирками к набору.
4. При работе с компонентами набора или с образцами всегда используйте одноразовые перчатки, тщательно мойте руки сразу после окончания работы.
5. Избегайте разбрызгивания реагентов и образцов!
6. Избегайте контактов реагентов с кожей, используйте защитные перчатки.
7. Все стадии необходимо выполнять согласно протокола. Необходимо точно соблюдать объемы всех реагентов и образцов, указанные в различных разделах инструкции (объемы при отборе пипеткой или в процессе подготовки).
8. Правильные результаты также зависят от использования поверенных откалиброванных пипеточных дозаторов.
9. Азид натрия может взаимодействовать свинцом и медью пробирок с образованием взрывчатых соединений, для предотвращения этого необходимо промывать их большим объемом воды.
10. 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.



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