

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НОРАДРЕНАЛІНУ (НОРЕПІНЕФРИНУ) У ПЛАЗМІ ТА СЕЧІ

BA E-6200, Noradrenaline ELISA Fast track

Каталог. № : **BA E-6200**
Кількість : **96**
Виробник : **LDN, (Німеччина)**

Методика від **07-07-2015**
Версія **13.0**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні збігатися.

1. Введення

1.1 Використання за призначенням та принцип тесту

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення норادرаліну (норепінефрину) у плазмі та сечі. Норадреналін (норепінефрин) екстрагується за допомогою цис-діол-специфічного спорідненого гелю, ацилюється і потім перетворюється ферментативно.

Конкурентний метод використовує мікропланшетний формат. Антиген пов'язаний з твердою фазою мікропланшета. Дериватизовані стандарти, контролю та зразки і пов'язані з твердою фазою аналіти конкурують за обмежену кількість сайтів зв'язування антитіл. Після того як система врівноважується, вільний антиген і комплекси вільного антигена-антитіла видаляються промиванням. Антитіло, пов'язане з твердою фазою, виявляється анти-кролячим IgG-пероксидаза кон'югатом з використанням TMB як субстрату. Реакцію контролюють при 450 нм.

Кількісне визначення аналізованих зразків розраховується за калібрувальною кривою, підготовленою з відомими концентраціями стандартів.

1.2 Клінічне застосування (Див. оригінал інструкції).

2. Застереження, рекомендації, попередження та обмеження при проведенні процедури

2.1 Процесуальні застереження, рекомендації та попередження

- 1) Цей набір призначений тільки для професійного використання. Користувачі повинні мати повне розуміння цієї інструкції для успішного використання цього набору. Тільки тест інструкції, прикладеної до набору, є дійсним, і повинен бути використаний для проведення аналізу. Надійна робота буде досягнута тільки шляхом суворого і ретельного дотримання наведеної інструкції.
- 2) Цей аналіз був затверджений для деяких типів зразків, як зазначено у *Використанні за призначенням* (зверніться до пункту 1.1). Будь-яке використання поза призначенням цього набору є відповідальністю користувача і виробника не несе відповідальності.
- 3) Принципи належної лабораторної практики (GLP) повинні бути дотримані.
- 4) Для того, щоб знизити вплив потенційно шкідливих речовин, носити халати, одноразові захисні рукавички і захисні окуляри, де це необхідно.
- 5) Усі реагентами та зразки повинні бути доведені до кімнатної температури і перемішані обережно, але ретельно перед використанням. Уникайте повторного заморожування і розморожування реагентів і зразків.
- 6) Для розведення використовувати деіонізовану, дистильовану або ультра-чисту воду.
- 7) Планшет складається зі смужок, які відокремлюються. Невикористані лунки повинні зберігатися при температурі від 2-8 °C в закритому мішечку з фольги з осушувачем і використовуватись в рамці, яка постачається.
- 8) Рекомендується проводити аналіз зразків в дублях, щоб мати можливість виявляти потенційні помилки піпетування.
- 9) Після того, як тест був запущений, всі кроки повинні бути завершені без перерв. Переконайтесь, що необхідні реактиви, матеріали та пристрої підготовлені у відповідний час.
- 10) Часи інкубації впливають на результати. Всі лунки повинні аналізуватись в тому ж порядку і в тих же часових інтервалах.
- 11) Щоб уникнути перехресного забруднення реагентів використовувати нові одноразові наконечники для дозування кожного реагенту, зразка, стандарту і контролю.
- 12) Стандартна крива повинна бути побудована для кожної постановки.
- 13) Контролі повинні бути включені в кожній постановці і попадати у визначені межі довірчого інтервалу. Довірчі інтервали вказані у QC-звіту, представленому в наборі.
- 14) Не змішуйте компоненти з різних наборів з різними номерами партій і не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, який вказаний на етикетці набору.
- 15) Уникайте контакту зі стоп розчином, що містить 0.25 M H₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри і опіки. У разі контакту зі шкірою або очима, промийте негайно водою.
- 16) TMB субстрат має подразнюючу дію на шкіру і слизову оболонку. У разі можливого контакту, промийте очі з великим об'ємом води і шкіру з милом і великою кількістю води. Вимийте забруднені об'єкти до їх повторного використання.
- 17) Для отримання інформації про небезпечні речовини, що входять в набір, будь ласка, зверніться до листів безпеки (MSDS). Лист даних з безпеки матеріалів для даного продукту доступний безпосередньо на сайті виробника або за запитом.
- 18) Очікувані референсні значення, наведені в цій інструкції, є лише орієнтовними. Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила власні інтервали.
- 19) Результати, отримані з цим набором, не повинні бути прийняті в якості єдиної підстави для будь-якого терапевтичного заключення, але повинні бути співвіднесені з іншими діагностичними тестами і клінічними спостереженнями.
- 20) Реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи і утилізуватись відповідно до національних правил.

2.2 Обмеження

Будь-яка неправильна робота зі зразками або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

2.2.1 Інтерферуючі речовини

Плазма

Зразки, що містять осадки або фібрин, або які є гемолітичними або ліпемічними, можуть призвести до неточних результатів.

24-годинна сеча

Будь ласка, зверніть увагу на *підготовку і зберігання зразків!* Якщо відсоток кінцевої концентрації кислоти занадто високий, то ємність Екстракційного Буфера є недостатньою. Як наслідок норадреналін НЕ буде екстрагований адекватно.

2.2.2 Інтерференція лікарських засобів

Немає відомих речовин (лікарських засобів), вживання яких заважає вимірюванню рівня норадреналіну в зразку.

2.2.3 Хук-ефект високої дози

Не спостерігався в цьому тесті.

3. Зберігання і стабільність

Зберігайте невідкриті реагенти при 2-8 °С до закінчення терміну придатності. Не використовуйте компоненти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетках набору. Після відкриття реагенти стабільні протягом 1 місяця при зберіганні при 2-8 °С. Після того, як упаковка була відкрита, слід подбати, щоб закрити її щільно з осушувачем знову.

4. Матеріали

4.1 Вміст набору

BA D-0090	Адгезивна Фольга - Готова до використання
Вміст:	Адгезивна фольга в пакеті, який закривається
Об'єм:	1 x 4 шт
BA E-0030	Концентрат промивного буфера - Концентрований 50x
Вміст:	Буфер з неіоногенним детергентом і фізіологічним рН
Об'єм:	1 x 20 мл/флакон, світло-фіолетовий ковпачок
BA E-0040	Ферментний кон'югат - Готовий до використання
Вміст:	Козячі анти-кролик імуноглобуліни, кон'юговані з пероксидазою
Об'єм:	1 x 12 мл/флакон, червоний ковпачок
BA E-0055	Субстрат – Готовий до використання
Вміст:	Хромогенний субстрат, містить тетраметилбензидин, субстратний буфер і перекис водню
Об'єм:	1 x 12 мл/флакон, чорний ковпачок
BA E-0080	Стоп-розчин - Готовий до застосування
Вміст:	0,25 М сірчаної кислоти
Об'єм:	1 x 12 мл/флакон, світло-сірий ковпачок
BA E-0231	Мікротитрувальні стрипи Норадреналіну - Готові до використання
Вміст:	1 x 96 і (12x8) мікропланшет з попереднім покриттям антигенами в жовтого кольору упаковці багаторазового використання з осушувачем
BA E-6210	Антисироватка Норадреналіну - Готова до використання
Вміст:	Анти-антигіла кролик до норадреналіну, жовтого кольору
Об'єм:	1 x 6 мл/флакон, жовтий ковпачок
BA R-0050	Постановочний Буфер – Готовий до використання
Вміст:	TRIS Буфер
Об'єм:	1x4 мл/флакон, зелений ковпачок

Стандарти і Контролі – Готові до використання

Кат. №	Компонент	Колір/ковпачок	Концентрація, нг/мл	Концентрація, нмоль/л	Об'єм/флакон
BA R-6601	Стандарт А	Білий	0	0	4 мл
BA R-6602	Стандарт В	Світло-жовтий	5	30	4 мл
BA R-6603	Стандарт С	Помаранчевий	20	118	4 мл
BA R-6604	Стандарт D	Темно-блакитний	75	443	4 мл
BA R-6605	Стандарт E	Світло-сірий	250	1478	4 мл
BA R-6606	Стандарт F	Чорний	1000	5910	4 мл
BA R-6651	Контроль 1	Світло-зелений	Зверніться до звіту QC для очікуваного значення і допустимого діапазону!		4 мл
BA R-6652	Контроль 2	Темно-червоний			4 мл
Перетворення:	Норадреналін (нг/мл) x 5.91 = Норадреналін (нмоль/л)				
Вміст:	Кислотний буфер з не-ртутним стабілізатором, насичений визначеним об'ємом норадреналіну				

BA R-6611 **Ацилюючий буфер** - Готовий до використання

Вміст: Буфер з легкою лужною рН для ацилювання

Об'єм: 1 x 20 мл/флакон, білий ковпачок

BA R-6612 **Ацилюючий реагент** - Готовий до використання

Вміст: Ацилюючий реагент в DMF і DMSO

Об'єм: 1 x 3 мл/флакон, світло-червоний ковпачок

Ідентифікація небезпеки:



H225 Легко займиста рідина і випаровування.

H360 Може завдати шкоди народжуваності або ненародженій дитині.

H319 Викликає серйозне подразнення очей.

BA R-6613 **Буфер для аналізу** - Готовий до використання

Вміст: 1M соляної кислоти і нертутний консервант

Об'єм: 1 x 6 мл/флакон, світло-сірий ковпачок

BA R-6614 **Коензим** - Готовий до використання

Вміст: S-аденозил-L-метионін

Об'єм: 1 x 4 мл/флакон, фіолетовий ковпачок

BA R-6615 **Фермент** - Ліофілізований

Вміст: Катехол-О-метилтрансфераза

Об'єм: 2 флакони, рожевий ковпачок

BA R-6617 **Екстракційний Буфер** - Готовий до використання

Вміст: Буфер містить карбонат

Об'єм: 1 x 6 мл/флакон, коричневий ковпачок

BA R-6618 **Екстракційний Планшет** - Готовий до використання

Вміст: 2 x 48-лункові планшети, покриті боронатним афінним гелем в закритому мішечку

BA R-6619 **Соляна кислота** - Готова до використання

Вміст: 0.025 M Соляна Кислота, жовтого кольору

Об'єм: 1 x 20 мл/флакон, темно-зелений ковпачок

4.2 Необхідні додаткові матеріали та обладнання, які не постачаються з набором

- Калібровані прецизійні піпетки об'ємом 10 - 700 мкл; 1 мл
- Пристрій для промивання планшета (ручний, напівавтоматичний або автоматичний)
- ІФА рідер, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм і, якщо можливо, при 620 - 650 нм
- Мікропланшетний шейкер (амплітуда коливань 3 мм; приблизно 600 обертів на хвилину).
- Абсорбуючий матеріал (паперові рушники)
- Вода (деіонізована, дистильована або ультра-чиста)
- Вортекс

5. Збір і зберігання зразків

Плазма

Цільна кров повинна бути зібрана в центрифужні пробірки, що містять ЕДТА в якості антикоагулянту (Monovette™ або Vacuette™ для плазми) і центрифугована відповідно до інструкцій заводу-виробника відразу після збору.

Гемолізовані і ліпемічні зразки не повинні бути використані для аналізу.

Зберігання: до 6 годин при температурі 2 - 8 °С, протягом тривалого періоду (до 6 місяців) при -20 °С.

Повторного заморожування і відтавання слід уникати.

Сеча

Можливе використання спонтанної сечі або добової сечі, зібраних у флакон, що містить 10 - 15 мл 6 М НСІ.

Якщо використовується добова сеча запишіть загальний об'єм зібраної сечі.

Зберігання: до 48 годин при температурі 2 - 8 °С, протягом 24 годин при кімнатній температурі, протягом більш тривалих періодів (до 6 місяців) при -20 °С. Повторного заморожування і відтавання слід уникати.

Уникайте впливу прямих сонячних променів.

6. Процедура Тесту

Всі реагенти привести до кімнатної температури і ретельно перемішати обережною інверсією перед використанням. Рекомендуються визначення в дублях.

Зв'язування антисироватки і ферментного кон'югату, а також активність ферменту залежать від температури, і поглинання може змінюватись, якщо не використовується термостат. Чим вища температура, тим вище буде поглинання. Зміна часу інкубації матиме подібний вплив на поглинання. Оптимальною температурою під час імуноферментного аналізу є 20 - 25 °С.

У разі перепоповнення, зчитати оптичну щільність розчину в лунках протягом 10 хвилин, використовуючи планшетний рідер при 405 нм.

6.1 Підготовка реагентів

Промивний буфер

Розведіть 20 мл концентрата Промивного Буфера водою (деіонізованою, дистильованою або ультра-чистою) до кінцевого об'єму 1000 мл.

Зберігання: 1 місяць при 2 - 8 °С

Ферментний розчин

Розвести вміст флакона з написом «Фермент» з 1 мл води (деіонізованої, дистильованої або ультра-чистої) і ретельно перемішати. Додати 0,3 мл Коферменту і 0,7 мл Постановочного Буфера. Загальний об'єм Ферментного Розчину становить 2,0 мл.

Ферментний Розчин повинен бути приготований безпосередньо перед аналізом (не більше, ніж за 10 - 15 хвилин). Знищити після використання!

6.2 Підготовка зразків, екстракція і ацилювання

1.	Внести 10 мкл стандартів, контролів, зразків сечі і 300 мкл зразків плазми у відповідні лунки Екстракційної Пластини.		
2.	Додати 250 мкл води (деіонізованої, дистильованої або ультра-чистої) в лунки зі стандартами, контролями та зразками сечі.		
3.	Внести 50 мкл Буфера для Аналізу в усі лунки.		
4.	Внести 50 мкл Екстракційного Буфера в усі лунки.		
5.	Накрити пластину Фольгою і інкубувати 30 хвилин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (приблизно 600 об./хв.).		
6.	Зняти фольгу. Перевернути планшет і висушити, постукуючи перевернутим планшетом по всмоктуючому папері.		
7.	Внести по 1 мл Промивного Буфера в усі лунки. Інкубувати планшет протягом 5 хвилин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (приблизно 600 об./хв.). Перевернути планшет і висушити, постукуючи перевернутим планшетом по всмоктуючому папері.		
8.	Внести ще 1 мл Промивного Буфера в усі лунки. Інкубувати планшет протягом 5 хвилин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (приблизно 600 об./хв.). Перевернути планшет і висушити, постукуючи перевернутим планшетом по всмоктуючому папері.		
9.	Внести 150 мкл Ацилюючого Буфера в усі лунки.		
10.	Внести 25 мкл Ацилюючого Реагента в усі лунки.		
11.	Інкубувати 15 хвилин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (близько 600 об./хв.).		
12.	Перевернути планшет і висушити, постукуючи перевернутим планшетом по всмоктуючому папері.		
13.	Внести 1 мл Промивного Буфера в усі лунки. Інкубувати планшет протягом 10 хвилин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (близько 600 об./хв.). Перевернути планшет і висушити, постукуючи перевернутим планшетом по всмоктуючому папері.		
14.	Піпетувати по 150 мкл Соляної Кислоти в усі лунки.		
15.	Накрити пластину Фольгою і інкубувати 10 хвилин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (приблизно 600 об./хв.). Зняти фольгу і викинути. Не зливати супернатант після цього! Наступні обсяги супернатанта необхідні для подальшого ELISA:		
	<table border="1"><tr><td>Норадреналін</td><td>20 мкл</td></tr></table>	Норадреналін	20 мкл
Норадреналін	20 мкл		

6.3 Норадреналін ІФА

1.	Внести 25 мкл Ферментного Розчину (див. 6.1) в усі лунки планшета Норадреналіна .
2.	Внести 20 мкл екстрагованих стандартів, контролів і зразків у відповідні лунки.
3.	Інкубувати протягом 30 хвилин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (приблизно 600 об./хв.).
4.	Внести 50 мкл Антисироватки Норадреналіну в усі лунки і накрити планшет за допомогою фольги .
5.	Інкубувати протягом 2 годин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (приблизно 600 об./хв.).
6.	Зняти фольгу. Видалити або аспірувати вміст лунок. Промити пластини 3х додаванням 300 мкл Промивного Буфера, видалюючи вміст і висушуючи перевертанням і постукуванням по всмоктуючому папері кожен раз .
7.	Внести 100 мкл Ферментного Кон'югату в усі лунки.
8.	Інкубувати протягом 30 хвилин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (приблизно 600 об./хв.).
9.	Видалити або аспірувати вміст лунок. Промити пластини 3х додаванням 300 мкл Промивного Буфера, видалюючи вміст і висушуючи перевертанням і постукуванням по всмоктуючому папері кожен раз .
10.	Внести 100 мкл Субстрату в усі лунки і інкубувати протягом 25 ± 5 хвилин при КТ (20 - 25 °С) на шейкері (приблизно 600 об./хв.).

Уникайте впливу прямих сонячних променів!

11. Додайте **100 мкл Стоп-Розчину** в кожну лунку і потрясіть планшет для забезпечення гомогенного розподілу розчину.

12. **Виміряти** оптичну щільність розчину в лунках протягом 10 хвилин, з використанням мікропланшетного рідера при 450 нм (якщо доступна довжина хвилі між 620 нм і 650 нм, рекомендується використати її як референтну).

7. Розрахунок результатів

Діапазон вимірювання	Норадреналін	
	Сеча	2.5 - 1000 нг/мл
Плазма	93 - 33333 пг/мл	

Стандартна крива отримується шляхом відкладання значень абсорбції (розрахувати середнє) стандартів (лінійні, вісь у) проти відповідних концентрацій стандартів (логарифмічні, вісь х). Використовуйте нелінійну регресію для побудови кривої (наприклад, сплайн, 4-х параметрову, акіма).

Зразки сечі і контролю

Концентрації **зразків сечі** і **Контролів 1 і 2** можна прочитати безпосередньо зі стандартної кривої.

Розрахуйте для кожного зразка добової сечі: **мкг/24 год = мкг/л x л/24**

Зразки плазми

Зчитані концентрації **зразків плазми** повинні бути **розділені на 30**.

Перетворення

Норадреналін (нг/мл) x 5,91 = Норадреналін (нмоль/л)

Очікувані еталонні значення

Настійно рекомендується, щоб кожна лабораторія повинна визначити власні нормальні і аномальні значення.

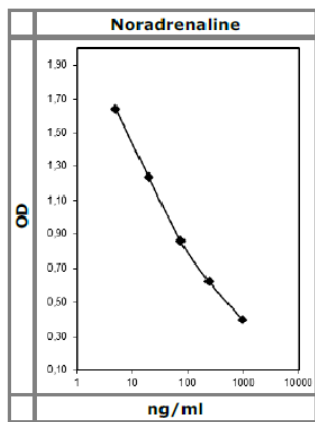
	Норадреналін
Добова сеча	< 90 мкг/день (535 нмоль/день)
Плазма	< 600 пг/мл

7.1 Контроль якості

Рекомендується використовувати контрольні зразки у відповідності з національними правилами. Використовуйте контролю нормальних і патологічних рівнів. Контролі набору або інші комерційні контролю повинні знаходитись в межах встановлених довірчих інтервалів. Довірчі інтервали вказані у QC-звіті.

7.2 Типова стандартна крива

Приклад, не використовуйте для розрахунку!

**8. Аналітичні характеристики**

Аналітична Чутливість	LOD	Норадреналін	
		Сеча (нг/мл)	1.7
LOQ	Плазма (пг/мл)	0.04	
	Сеча (нг/мл)	2.5	
	Плазма (пг/мл)	93	

Аналітична Специфічність (Перехресна Реактивність)	Субстанція	Перехресна Реактивність (%)
		Норадреналін
	Дериватизований Адреналін	0.08
	Дериватизований Норадреналін	100
	Дериватизований Допамін	0.03
	Метанефрин	< 0.01
	Норметанефрин	0.16
	3-Methoxytyramine	< 0.01
	3-метокси-4-hydroxyphenylglycol	< 0.01
	Тирамін	< 0.01
	Феніланін, Кофеїнова кислота, L-Dopa, Гомованілінова кислота, Тирозин, 3-метокси-4-гідроксиміндальна кислота	< 0.01

Точність							
В аналізі, Сеча (n=60)				В аналізі, Плазма (n=60)			
	Зразок	Діапазон (нг/мл)	CV (%)		Зразок	Діапазон (нг/мл)	CV (%)
Норадреналін	1	26.1 ± 3.6	13.8	Норадреналін	1	510 ± 65	12.8
	2	97 ± 12.8	13.4		2	1358 ± 194	14.3
	3	267 ± 35	13.1		3	3363 ± 374	11.1
Між аналізами, Сеча (n=33)				Між аналізами, Плазма (n=18)			
	Зразок	Діапазон (нг/мл)	CV (%)		Зразок	Діапазон (нг/мл)	CV (%)
Норадреналін	1	19.5 ± 3.9	20.0	Норадреналін	1	445 ± 40.9	9.2
	2	80.6 ± 10.6	13.2		2	1232 ± 134	10.9
	3	226 ± 39.5	17.4		3	3283 ± 302	9.2
Лінійність			Серійне розведення до	Діапазон (%)	Середнє (%)		
	Норадреналін	Сеча	1:512	100 - 127	112		
		Плазма	1:512	102 - 125	112		
Відновлення			Середнє (%)	Діапазон (%)	Діапазон		
	Норадреналін	Сеча	103	91 - 113	58.6 – 230 нг/мл		
		Плазма	87	75 - 107	51 – 16735 пг/мл		



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com