

НАБІР РЕАГЕНТІВ

МЕТАНЕФРИН / НОРМЕТАНЕФРИН (ПЛАЗМА) ELISA

Met Combi Plasma ELISA

Каталог. № : EIA-4082

Дата випуску інструкції: 2015/05
Версія 15.0



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 Призначення і принцип тесту

Імуноферментний аналіз для визначення вільного Метанефрину і вільного Норметанефрину в плазмі.

По-перше, плазмові білки видаляються шляхом осадження. Після цього Метанефрин (Metadrenaline) і Норметанефрин (Normetadrenaline) кількісно ацилюються.

Тест являє собою твердофазовий конкурентний метод імуноферментного аналізу на мікропланшетах. Антигени іммобілізовані на поверхні лунок мікропланшета (твердій фазі). Ацильовані стандарти, контролю та зразки і іммобілізовані на твердій фазі аналіти конкурують за обмежене число центрів зв'язування специфічних антитіл. Коли система досягне рівноваги, комплекси вільний антиген та вільний антиген-антитіло видаляються промиванням. Антитіла, зв'язані з твердою фазою, виявляють кон'югатом анти кролячі IgG-пероксидаза. Як субстрат використовується ТМБ. Інтенсивність реакції вимірюють при довжині хвилі 450 нм. Кількісне визначення аналізованих зразків досягається при порівнянні їх абсорбції за калібрувальною кривою, побудованою з відомими стандартами.

Антитіла, які використовуються в цьому наборі, визначають тільки біологічно активні L-форми Метанефринів.

Комерційно доступні синтетичні Норметанефрин або Метанефрин завжди є сумішшю D- і L-форм. Співвідношення між двома формами сильно відрізняється від партії до партії. Це має важливе значення, якщо синтетичні Метанефрини використовуються для збагачення нативних зразків. Так як тільки близько 50% синтетичних Метанефринів - L-порція - буде виявлено за допомогою цього набору, насичені зразки будуть недооцінені. Тому використовувати тільки нативні зразки, що містять виключно L-форму.

1.2 Клінічне застосування

Метанефрин та Норметанефрин є метаболітами катехоламінів епінефрину та норепінефрину відповідно. Відомо, що клітини, отримані з нейроендокринних пухлин (наприклад, феохромоцитом), продукують катехоламіни, які епізодично виділяються через везикули в кров. Але крім цього, невелика частина катехоламінів метаболізується всередині клітин до відповідних метаболітів катехоламінів, а саме метанефрину, норметанефрину та 3-метокситираміну-які безперервно секретуються у кров.

Останні дослідження та публікації показали, що кількісна оцінка цих метанефринів без плазми та норметанефрину без плазми є найточнішим біохімічним маркером для клінічної діагностики феохромоцитом та спостереження за пацієнтами з феохромоцитомою.

Терапевтичні наслідки ніколи не повинні базуватися лише на лабораторних результатах, навіть якщо всі результати тестів узгоджуються з пунктами, зазначеними в розділі «Процедурні застереження, вказівки та попередження». Будь-який лабораторний результат - це лише частина загальної клінічної картини пацієнта.

Тільки у тих випадках, коли результати лабораторних досліджень відповідають загальній клінічній картині пацієнта, їх можна використовувати для терапевтичних наслідків.

Сам результат тесту ніколи не повинен бути єдиним визначальним фактором для отримання будь-яких терапевтичних висновків.

2 ЗАУВАЖЕННЯ ЩОДО ПРОЦЕДУРИ, ВКАЗІВКИ, ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ОБМЕЖЕННЯ

2.1 Зауваження щодо процедури, вказівки та застереження

1. Набір призначений тільки для професійного використання. Перед початком дослідження прочитайте інструкцію повністю й уважно. Використовуйте дійсну версію інструкції, прикладену до набору. Переконайтеся, що вам все зрозуміло.
2. Набір призначений для використання з визначеним типом зразка, як зазначено в розділі *Призначення*. (див. Розділ 1). Виробник не несе відповідальності за неправильне використання набору.
3. Всі реагенти цього набору, які містять сироватку або плазму людини, були протестовані і показали негативний результат на HIV I/II, HBsAg та HCV за методами схваленим FDA. Однак, не існує методів, що гарантують повну відсутність цих речовин. Тому, всі реагенти повинні вважатися потенційно небезпечними.
4. Дотримуватись принципів Належної Лабораторної Практики (GLP).
5. Щоб зменшити ймовірність впливу шкідливих речовин, використовуйте захисний одяг, одноразові рукавички та захисні окуляри.
6. Привести всі реагенти та зразки до кімнатної температури та добре перемішати перед використанням. Уникати повторного заморожування та розморожування реагентів та зразків.
7. Для розведення та відновлення використовувати деіонізовану, дистильовану або очищену воду.
8. Мікротитровий планшет містить роздільні стрипи. Невикористані лунки повинні зберігатися при 2-8 °C в пакеті з фольги і використовуватися з рамкою, що надається.
9. Для ідентифікації потенційних помилок піпетування, рекомендується проводити подвійний аналіз зразків.
10. Усі етапи під час тестування слід проводити без перерви. Впевніться, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої готові перед початком аналізу.
11. Час інкубації впливає на результати. Усі лунки повинні оброблятися в однаковому порядку та з однаковими інтервалами.
12. Щоб уникнути перехресне забруднення реагентів, використовуйте нові одноразові наконечники для піпетування кожного реагенту, зразка, стандарту та контролю.
13. Стандартна крива будується для кожного запуску.
14. Контролі повинні бути включені в кожен запуск та знаходитись у встановлених інтервалах. Інтервали вказані у Звіті КЯ.
15. Не змішуйте і не використовуйте компоненти з різних лотів. Не використовувати реагенти після закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці.
16. Уникайте контакту зі стоп розчином - 0.25M H₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри або опіки. При контакті промити великою кількістю води.
17. Деякі реагенти містять азид натрію в якості консерванту. У разі їх контакту з очима або шкірою, промийте цю ділянку водою. Азид натрію може реагувати зі свинцем або міддю з утворенням азидів металів. При утилізації змити великою кількістю води, щоб уникнути накопичення азидів.
18. Розчин субстрату ТМБ має подразнюючий ефект на шкіру та слизові. У разі контакту, промийте очі з великим об'ємом води і шкіру з милом і великою кількістю води. Промийте забруднені об'єкти перед повторним використанням. У разі вдихання реагентів, виведіть людини на свіже повітря.
19. За інформацією про небезпечні речовини звертатись до Паспорту безпеки, який надається за запитом.
20. Очікувані референсні значення наведені в даній інструкції тільки для прикладу. Кожній лабораторії рекомендується встановити власні референсні значення.
21. Результати, отримані з даним набором, не можуть бути єдиним критерієм для встановлення діагнозу (напр. прийом ліків перед запланованою операцією), але їх слід співвідносити з іншими діагностичними тестами та клінічними спостереженнями.
22. Реагенти набору вважати небезпечними відходами, і утилізувати відповідним чином.

2.2 Обмеження

Будь-яке неправильне поводження з реагентами або модифікація даного тесту можуть вплинути на результати.

2.2.1 Інтерферуючі речовини

Плазма

Зразки, які містять осад або фібрин, або є гемолітичними чи ліпемічними, можуть призвести до помилкових результатів.

2.2.2 Вплив лікарських засобів

Немає відомих лікарських засобів, вживання яких впливає на визначення рівнів (Нор)-метанефрину у зразку.

2.2.3 Хук-ефект високої дози

З даним набором хук-ефект не спостерігався.

3 ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Зберігати реагенти при 2-8 °С до закінчення терміну придатності. Не використовуйте компоненти набору після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці. Розкриті реагенти стабільні протягом 1 місяця за умови зберігання при температурі 2-8 °С. Після розкриття пакета з фольги, його слід знову щільно закрити разом із осушувачем.

4 МАТЕРІАЛИ

4.1 Вміст набору

REAC-TUBES Реакційні Пробірки - Готові до використання.

Вміст: Реакційні пробірки в пакеті на замку
Об'єм: 2 x 50 пробірок

FOILS Клейка плівка - Готова до використання

Вміст: Плівки для заклеювання в пакеті на замку
Об'єм: 2 x 4 шт.

WASH-CONC 50x Концентрат промивного буферу – Концентрат 50x
Вміст: Буфер з неіонізованим детергентом та фізіологічним рН
Об'єм: 2 x 20 мл/флакон, ковпачок світло фіолетового кольору

CONJUGATE Ферментний кон'югат - Готовий до використання

Вміст: Козячі імуноглобуліни проти кролячих, кон'юговані з пероксидазою
Об'єм: 2 x 12 мл/флакон, ковпачок червоного кольору

SUBSTRATE Субстрат - Готовий до використання

Вміст: Хромогенний субстрат, містить ТМБ, буфер субстрату та перекис водню
Об'єм: 2 x 12 мл/флакон, ковпачок чорного кольору

STOP-SOLN Стоп-розчин - Готовий до використання

Вміст: 0.25 М сірчаної кислоти
Об'єм: 2 x 12 мл/флакон, ковпачок світло-сірого кольору

ADR MN Мікротитрові смужки Метанефрину – Готові до використання

Вміст: 1 x 96 лунок (12x8) Мікропланшет з нанесеним антигеном в блакитному пакеті з осушувачем

NAD NMN Мікротитрові смужки Норметанефрину – Готові до використання

Вміст: 1 x 96 лунок (12x8) Мікропланшет з нанесеним антигеном в жовтому пакеті з осушувачем

MN-AS Антисироватка до Метанефрину – Готова до використання

Вміст: Кролячі антитіла анти-Метанефрину, блакитного кольору
Об'єм: 1 x 6 мл/флакон, блакитний ковпачок

NMN-AS Антисироватка до Норметанефрину – Готова до використання

Вміст: Кролячі антитіла анти-Норметанефрину, жовтого кольору
Об'єм: 1 x 6 мл/флакон, жовтий ковпачок

ASSAY-BUFF Буфер для аналізу – Готовий до використання


Вміст: TRIS-Буфер містить протеїни та не ртутний консервант
Об'єм: 1 x 12 мл/флакон, помаранчевий ковпачок

EQUA-REAG Стабілізуючий реагент – Ліофілізований

Вміст: Людська сироватка, негативна до HIV I/II, HBsAg та HCV
Об'єм: 2 флакона, темно-зелений ковпачок

ACYL-CONC Ацилюючий Концентрат – Концентрований

Вміст: Ацилюючий реагент в DMSO
Об'єм: 1 x 1.5 мл/флакон, темно-сірий ковпачок

Ідентифікація  H302 Шкідливий при ковтанні небезпек:

Стандарти і Контролі – Готові до використання

Компонент	Копір/ковпачок	Концентрація, пг/мл		Концентрація, пмоль/л		Об'єм/флакон
		NM	NMN	NM	NMN	
Стандарт А	Білий	0	0	0	0	12 мл
Стандарт В	Світло-жовтий	36	48	183	262	4 мл
Стандарт С	Помаранчевий	120	160	608	874	4 мл
Стандарт D	Темно-синій	360	480	1825	2621	4 мл
Стандарт E	Світло-сірий	1200	1600	6084	8736	4 мл
Стандарт F	Чорний	3600	4800	18252	26208	4 мл
Контроль 1	Світло-зелений	Очікувані значення та прийнятний діапазон				4 мл
Контроль 2	Темно-червоний	вказані в Паспорті Безпек				4 мл

Конверсія: Метанефрин (пг/мл) x 5.07 = Метанефрин (пмоль/л)
Норметанефрин (пг/мл) x 5.46 = Норметанефрин (пмоль/л)

Вміст: Буфер зі стабілізатором та осаджуючий реагент, насичений певною кількістю Метанефрину та Норметанефрину

Ідентифікація  H302 Шкідливий при ковтанні небезпек:

4.2 Необхідні додаткові матеріали та обладнання, що не входять до складу набору

- Калібровані точні піпетки об'ємом 25-500 мкл; 3 мл; 10 мл
- Пристрій для промивання планшетів (ручний, напівавтомат або автомат)
- Планшетний фотометр, здатний вимірювати оптичну щільність при довжині хвилі 450 нм та, якщо можливо, 620-650 нм
- Центрифуга на 3000xg
- Мікротитровий шейкер планшетів (з амплітудою струшування 3 мм; приблизно 600 об/хв)
- Абсорбуючий матеріал (паперові рушники)
- Вода (деіонізована, дистильована або ультра чиста)
- Вортекс

5 ЗАБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

ЕДТА-, Цитратна або Гепаринова плазма

Цільну кров зібрати в центрифужні пробірки, які містять ЕДТА, гепарин або цитрат в якості антикоагулянту, та центрифугувати відразу після забору.

Гемолізовані і ліпемічні зразки не повинні бути використані для аналізу.

Зберігання: до 6 годин при температурі 2 - 8 °С
на більш тривалій термін (до 6 місяців) при - 20 °С
Повторного заморожування і розморожування слід уникати.

6 ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ

Перед використанням всі реагенти слід прогріти до кімнатної температури і акуратно перемішати. Відрахувати необхідне число реакційних пробірок. Рекомендується проводити аналіз в дублікатах.

Зв'язування антитіл та ферментних кон'югатів і активність ферменту, який використовується, залежать від температури. Значення абсорбції можуть варіюватись, якщо термостат не використовується. Чим вища температура, тим вищі значення щільності. Значення абсорбції також залежать від часу інкубації. Оптимальна температура для проведення аналізу становить 20-25 °С.

При переливанні зчитати оптичну щільність розчину в лунках на протязі 10 хвилин за допомогою мікропланшетного рідера при 405 нм.

6.1 Приготування реагентів

Промивний буфер

Розчинити 20 мл Концентрату Промивного Буфера з водою (деіонізованою, дистильованою або ультра чистою) до кінцевого об'єму 1000 мл.

Зберігати при 2-8 °С до 1 місяця.

Стабілізуючий реагент

Відновити Стабілізуючий реагент з 10 мл води (деіонізованої, дистильованої або ультра чистої).

Відновлений Стабілізуючий реагент, який не використовується негайно, повинен зберігатися в аліквотах при -20 °С, максимум, 1 місяць і може бути розморожений тільки один раз.

Ацилюючий розчин

Оскільки Ацилюючий реагент стабільний протягом тільки 3 хвилин, його не слід готувати перед початком аналізу. Процес підготовки описаний в розділі 6.3, крок 3 та розділі 6.4, крок 3. Утилізувати після використання!

6.2 Підготовка зразків

Процедура осадження однакова для *Метанефрину та Норметанефрину* і проводиться тільки один раз.

6.2.1 Осадження

1. Піпетувати **100 мкл стандартів, 100 мкл контролів і 500 мкл зразків плазми** у відповідні **Реакційні Пробірки**.
2. Додати **500 мкл Стабілізуючого Реагенту** (див. пункт 6.1) в усі пробірки із стандартами і контролями.
3. Додати **100 мкл Стандарту А** в усі пробірки, що містять зразки плазми.
4. Ретельно перемішати вміст **Реакційних Пробірок** (вортекс) і центрифугувати протягом **15 хвилин** при **3000 x g**.
5. Взяти **75 мкл** чистого супернатанту для ІФА аналізу Метанефрину і **25 мкл** чистого супернатанту для ІФА аналізу Норметанефрину.

6.3 Імуноферментний аналіз Метанефрину

1. Внести **50 мкл Буфера для аналізу** у відповідні лунки планшета **Метанефрину**.
2. Внести **75 мкл чистого супернатанту** від **стандартів, контролів та зразків** в лунки.
3. Приготування **Ацилюючого розчину**:
Додати **80 мкл Концентрату Ацилюючого Реагенту до 3 мл води** (деіонізованої, дистильованої або ультра чистої), ретельно перемішати.
4. Внести по **25 мкл** свіжо приготовленого **Ацилюючого Розчину** в усі лунки.
5. Інкубуйте протягом **15 хвилин** при **КТ (20-25 °С)** на шейкері (близько 600 об./хвилину).
6. Внести **50 мкл Антисироватки Метанефрину** в усі лунки.
7. Закрити планшет **Плівкою**, струснути протягом **1 хвилини** при **КТ (20-25 °С)** на шейкері і витримати протягом **15-20 годин** (на ніч) при температурі **2-8 °С** без струшування.
8. Зняти фольгу. Видалити або аспірувати вміст лунок і ретельно промити кожну лунку **4 рази** з **300 мкл Промивного Буфера, утилізувавши** вміст і **висушивши**, планшет, шляхом постукування ним по абсорбуючому матеріалу.
9. Внести **100 мкл Ферментного Кон'югату** у всі лунки.
10. Інкубувати протягом **30 хвилин** при **КТ (20-25 °С)** на **шейкері** (близько 600 об./хвилину).
11. Видалити або аспірувати вміст лунок і промити кожну лунку **4 рази** ретельно з **300 мкл Промивного Буфера**. Висушити, шляхом постукування перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
12. Внести **100 мкл Субстрату** в кожну лунку і інкубувати протягом **20-30 хвилин** при **КТ (20-25 °С)** на **шейкері** (близько 600 об./хвилину). **Уникайте впливу прямих сонячних променів!**
13. Додати **100 мкл Стоп-Розчину** в кожну лунку і струсити планет для забезпечення гомогенного розподілу розчину.
14. **Зчитати** абсорбцію розчину в всіх лунках протягом 10 хвилин за допомогою планшетного рідера при **450 нм** і довжині хвилі між 620 нм і 650 нм.

6.4 Імуноферментний аналіз Норметанефрину

1. Внести **50 мкл Буфера для аналізу** у відповідні лунки планшета **Норметанефрину**.
2. Внести **25 мкл чистого супернатанту** від **стандартів, контролів та зразків** в лунки.
3. Приготування **Ацилюючого розчину**:
Додати **80 мкл Концентрату Ацилюючого Реагенту до 3 мл води** (деіонізованої, дистильованої або ультра чистої), ретельно перемішати.
4. Внести по **25 мкл** свіжо приготовленого **Ацилюючого Розчину** в усі лунки.
5. Інкубуйте протягом **15 хвилин** при **КТ (20-25 °С)** на **шейкері** (близько 600 об./хвилину).
6. Внести **50 мкл Антисироватки Норметанефрину** в усі лунки.

7. Закрити планшет **Плівкою**, струснути протягом **1 хвилини** при **КТ (20-25 °С)** на **шейкері** і витримати протягом **15-20 годин** (на ніч) при температурі **2-8 °С** без струшування.
8. Зняти фольгу. Видалити або аспірувати вміст лунок і промити кожну лунку **4 рази** ретельно з **300 мкл Промивного Буфера**. Висушити постукуванням перевернутим планшетом по абсорбуючому папері.
9. Внести **100 мкл Ферментного Кон'югату** в кожну лунку.
10. Інкубувати протягом **30 хвилин** при **КТ (20-25 °С)** на **шейкері** (близько 600 об./хвилину).
11. Видалити або аспірувати вміст лунок і промити кожну лунку **4 рази** ретельно з **300 мкл Промивного Буфера**. Висушити постукуванням перевернутим планшетом по абсорбуючому папері.
12. Внести **100 мкл Субстрату** в кожну лунку і інкубувати протягом **20-30 хвилин** при **КТ (20-25 °С)** на **шейкері** (близько 600 об./хвилину). **Уникайте впливу прямих сонячних променів!**
13. Додати **100 мкл Стоп-Розчину** в кожну лунку і струсити планшет для забезпечення гомогенного розподілу розчину.
14. **Зчитати** оптичну щільність розчину в лунках протягом 10 хвилин за допомогою планшетного рідера при **450 нм** і довжині хвилі між 620 нм і 650 нм.

7 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Діапазон вимірювання	Метанефрин	Норметанефрин
	17 – 3600 пг/мл	23 – 4800 пг/мл

Калібрувальна крива може бути отримана шляхом відкладання абсорбції (розрахуйте середню абсорбцію стандартів (лінійно, вісь у) проти відповідних стандартних концентрацій (логарифмічно, вісь x). Використовувати нелінійну регресію для кривої (напр., сплайн, 4 - параметри, акіта).

Концентрації **зразків і контролів** можна зчитати безпосередньо зі стандартної кривої.

Зразки з концентрацією вище, ніж найвищий стандарт (Стандарт F) повинні бути розведені відповідно зі Стабілізуючим Реагентом, і повторно проаналізовані.

Конверсія Метанефрин (пг/мл) × 5.07 = Метанефрин (пмоль/л)
Норметанефрин (пг/мл) × 5.46 = Норметанефрин (пмоль/л)

Очікувані референсні значення

Кожній лабораторії рекомендується визначити свої власні референсні значення.

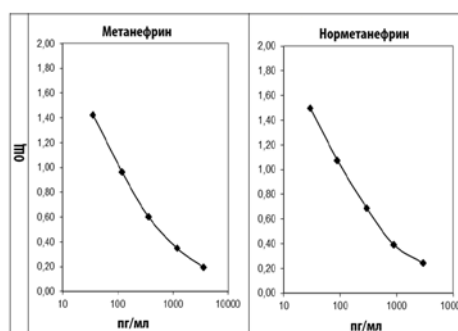
Метанефрин	Норметанефрин
< 90 пг/мл	< 180 пг/мл

7.1 Контроль якості

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до державних вимог. Використовуйте контролі як з нормальними, так і з патологічними рівнями. Контролі з набору та інші комерційні контролі не повинні виходити за рамки заданих діапазонів. Довірчі межі діапазони контролів DRG вказані в звіті контролю якості (QC Report).

7.2 Типові калібрувальні криві

Не використовуйте дані приклади для обчислення!



8 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

Аналітична Чутливість (Межа виявлення)		Метанефрин	Норметанефрин
	Плазма	17 пг/мл	23 пг/мл

Аналітична специфічність (Перехресна реактивність)	Компонент	Перехресна реакція (%)	
		Метанефрин	Норметанефрин
		Похідний Метанефрин	100
Похідний Норметанефрин	0.04	100	
3-Метокситирамін.НСІ	<0.001	1.74	
Адреналін	<0.001	<0.001	
Норадреналін	<0.001	<0.001	
Допамін.НСІ	<0.001	<0.001	
VMS	<0.001	<0.001	
HMVS	<0.001	<0.001	
L-DOPA	<0.001	<0.001	
L-тирозин	<0.001	<0.001	
Тирамін.НСІ	<0.001	<0.001	
Норметанефрин	<0.001	<0.001	
Ацетамінофен	<0.001	<0.001	

Точність							
В аналізі				Між аналізами			
	Зразок	Діапазон, пг/мл	КВ (%)		Зразок	Діапазон, пг/мл	КВ (%)
Метанефрин	1	155±17	11	Метанефрин	1	133±13	10
	2	245±28	11		2	257±23	8.9
	3	523±38	7.3		3	528±50	9.5
Норметанефрин	1	167±12	7.3	Норметанефрин	1	161±18	11
	2	373±29	7.8		2	370±19	5.1
	3	832±60	7.2		3	844±51	6.0

Лінійність			Діапазон, пг/мл	Серійне розведення, до	Середнє, %
	Метанефрин	Плазма	41-2100	1:65	109
	Норметанефрин	Плазма	58-5800	1:129	109

Відновлення			Середнє значення, %	Діапазон, %	% Відновлення
	Метанефрин	Плазма	97	85-111	
	Норметанефрин	Плазма	92	80-108	

Метод порівняння: ЮА з LC-MS/MS	Метанефрин	Плазма	LC-MS/MS = 1.1x - 19.4	r = 0.98; n = 59
	Норметанефрин	Плазма	LC-MS/MS = 1.2x - 10.5	r = 0.99; n = 59



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

