



IMMUNOASSAYS AND SERVICES

BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Інструкція із застосування

3-CAT ІФА

Експрес метод



Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com.
www.novamedline.com

REF

BA E-6600



IVD



1. вступ

1.1 Цільове використання та принцип тесту

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення адреналіну (епінефрину), норадреналіну (норадреналіну) і дофаміну в плазмі та сечі.

Адреналін (епінефрин), норадреналін (норадреналін) і дофамін екстрагуються за допомогою цис-діол-специфічного афінного гелю, ацилюються і потім перетворюються ферментативно.

Конкурентоспроможний набір ІФА використовує формат мікропланшету. Антиген зв'язується з твердою фазою мікротитраційного планшету. Дериватизовані стандарти, контролю та зразки, а також аналіти, пов'язані з твердою фазою, конкурують за фіксовану кількість сайтів зв'язування антитіл. Після того, як система досягне рівноваги, вільний антиген і вільні комплекси антиген-антитіло видаляють промиванням. Антитіло, зв'язане з твердою фазою, виявляється за допомогою кон'югату IgG-пероксидази кролика з використанням ТМБ як субстрату. Реакцію контролюють при 450 нм.

Кількісне визначення невідомих зразків досягається шляхом порівняння їх абсорбції зі стандартною кривою, підготовленою з відомими стандартними концентраціями.

1.2 Клінічне застосування

У людини катехоламіни адреналін (адреналін), норадреналін (норадреналін) і дофамін є нейромедіаторами симпатичної нервової системи і беруть участь у багатьох фізіологічних процесах. Симпатична нервова система приводить організм у стан підвищеної готовності, який також називають реакцією організму на боротьбу або втечу.

В організмі людини катехоламіни та їх метаболіти свідчать про адаптацію організму до гострого та хронічного стресу.

Окрім метанефрину/норметанефрину, катехоламіни важливі для діагностики та спостереження за пухлинами симпатoadреналової системи, такими як феохромоцитомі. Кількісне визначення катехоламінів у сечі є кращим для діагностики цих пухлин, тоді як визначення катехоламінів у плазмі є медичним доцільним для локалізації пухлини та для функціонального тестування. Значення, що перевищують межу, можуть вказувати на нейроендокринні пухлини.

Проте в літературі описуються різні захворювання, такі як гіпертонія, серцево-судинні захворювання, шизофренія та маніакальна депресія, з аномально низькими або високими рівнями катехоламінів.

Терапевтичні наслідки ніколи не повинні ґрунтуватися лише на результатах лабораторних досліджень, навіть якщо всі результати тестів узгоджуються з пунктами, як зазначено в пункті «Процедурні застереження, рекомендації та попередження». Будь-який лабораторний результат є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта.

Лише у випадках, коли лабораторні результати прийнятно збігаються із загальною клінічною картиною пацієнта, їх можна використовувати для терапевтичних наслідків.

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

2. Процедурні застереження, вказівки, попередження та обмеження

2.1 Процедурні застереження, вказівки та попередження

- (1) Цей набір призначений лише для професійного використання. Користувачі повинні мати повне розуміння цього протоколу для успішного використання цього набору. Лише інструкція до тесту, що надається разом з набором, є дійсною і повинна використовуватися для проведення аналізу. Надійна робота буде досягнута лише за умов суворого та ретельного дотримання наданих інструкцій.
- (2) Цей аналіз був валідований для певних типів зразків, як зазначено в Передбачуваному використанні (будь ласка, див. розділ 1). Відповідальність за використання цього набору не за призначенням несе користувач, і виробник не несе відповідальності.
- (3) Необхідно дотримуватися принципу належної лабораторної практики (НЛП).
- (4) Щоб зменшити вплив потенційно шкідливих речовин, одягайте лабораторні халати, одноразові захисні рукавички та захисні окуляри, де це необхідно.
- (5) Усі агенти та зразки з набору слід довести до кімнатної температури та обережно, але ретельно перемішати перед використанням. Уникайте повторного заморожування та відтавання реагентів і зразків.
- (6) Для розведення або відновлення використовуйте дейонізовану, дистильовану або надчисту воду.
- (7) Мікропланшет містить стріпи, що відриваються. Невикористані лунки слід зберігати при температурі 2–8 °C у герметичному пакеті з фольги з осушувачем і використовувати в наданій рамці. Стріпи для мікротитрування, які виймаються з рами для використання, повинні бути відповідно помічені, щоб уникнути будь-якої плутанини.
- (8) Настійно рекомендується повторне визначення зразка, щоб мати можливість виявити потенційні помилки піпетування.
- (9) Після початку тесту всі кроки повинні бути завершені без перерви. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої підготовлені в належний час.
- (10) Час інкубації впливає на результати. Усі лунки слід обробляти в однаковому порядку та з однаковими інтервалами часу.
- (11) Щоб уникнути перехресного забруднення реагентів, використовуйте нові одноразові наконечники піпеток для дозування кожного реагенту, зразка, стандарту та контролю.
- (12) Стандартна крива повинна бути встановлена для кожного циклу.

- (13) Контролі повинні бути включені в кожен прогін і знаходитися в межах встановлених довірчих меж. Межі достовірності вказані у звіті про контроль якості, що надається разом із набором.
- (14) Не змішуйте компоненти набору з різними номерами партій у тесті та не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетках набору.
- (15) Уникайте контакту зі стоп-розчином, що містить 0,25 М Н₂SO₄. Це може викликати подразнення шкіри та опіки. У разі потрапляння в очі або на шкіру негайно змийте водою.
- (16) Субстрат ТМБ має подразнюючу дію на шкіру та слизові оболонки. У разі можливого контакту промити очі великою кількістю води, а шкіру – великою кількістю води з милом. Вимийте забруднені предмети перед повторним використанням.
- (17) Для отримання інформації про небезпечні речовини, що входять до набору, зверніться до паспорта безпеки (SDS). Паспорт безпеки для цього продукту доступний безпосередньо на веб-сайті виробника або за запитом.
- (18) Очікувані контрольні значення, зазначені в цій інструкції з тестування, є лише орієнтовними. Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні контрольні інтервали.
- (19) Результати, отримані за допомогою цього набору для тестування, не слід сприймати як єдину причину будь-яких терапевтичних наслідків (наприклад, прийом ліків перед запланованою операцією), але їх потрібно співвіднести з пропонованими діагностичними тестами та клінічними спостереженнями.
- (20) Реагенти набору слід розглядати як небезпечні відходи та утилізувати відповідно до національних норм.
- (21) У разі будь-якого серйозного пошкодження тестового набору або компонентів виробник повинен бути проінформований письмово не пізніше ніж через тиждень після отримання набору. Сильно пошкоджені окремі компоненти не можна використовувати для тестового запуску. Їх потрібно правильно зберігати, поки виробник не вирішить, що з ними робити. Якщо буде вирішено, що вони більше не придатні для вимірювань, їх необхідно утилізувати відповідно до національних норм.

2.2 Обмеження

Будь-яке неналежне поводження зі зразками або модифікація цього тесту може вплинути на результати.

2.2.1 Впливаючі речовини

плазма

Інструкції

Зразки, що містять преципітати чи нитки фібрину, або які є гемолітичними чи ліпемічними, можуть спричинити неточні результати. Гемолітичні проби (до 4 мг/мл гемоглобіну), жовтяничні проби (до 50 мг/дл білірубину) і ліпемічні проби (до 800 мг/дл тригліцеридів) не впливають на результати аналізу.

Якщо концентрації неможливо оцінити та є сумніви щодо дотримання вищевказаних граничних значень для гемолітичних, жовтяничних або ліпемічних зразків, зразки не повинні використовуватися в аналізі.

24-годинна сеча

Зверніть увагу на підготовку зразка! Якщо відсоток кінцевої концентрації кислоти занадто високий, це призведе до неправильних результатів зразків сечі.

2.2.2 Вплив ліків

Немає відомих речовин (ліків), прийом яких перешкоджає вимірюванню рівня катехоламінів у зразку.

2.2.3 Ефект хука високої дози

У цьому тесті ефекту Хука не спостерігалось.

3. Зберігання та стабільність

Зберігайте невідкриті реагенти при 2–8°C до закінчення терміну придатності. Не використовуйте компоненти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетках набору. Після відкриття реагенти стабільні протягом 2 місяців за умови зберігання при 2–8 °C. Після відкриття пакета, що закривається, слід подбати про те, щоб знову щільно закрити його осушувачем.

4. Матеріали

4.1 Вміст набору

ВА D-0090

FOILS

Клейка фольга– Готовий до використання

Зміст: Клейка фольга в пакеті, що закривається

обсяг: 3 x 4 фольги


ВА E-0030

WASH-CONC 50x

Концентрат промивного буфера– Концентрований 50x

Зміст: Буфер з неіонним миючим засобом і фізіологічним рН

обсяг: 3 x 20 мл/флакон, світло-фіолетовий ковпачок

- BA E-0040** **Ферментний кон'югат**– Готовий до використання
 Зміст: Козячі антикролячі імуноглобуліни, кон'юговані з пероксидазою
 обсяг: **CONJUGATE** 3 x 12 мл/флакон, червоний ковпачок
- BA E-0055** **Субстрат**– Готовий до використання
 Зміст: Хромогенний субстрат, що містить тетраметилбензидин, буфер субстрату і водню
SUBSTRATE перекис
 обсяг: 3 x 12 мл/флакон, чорний ковпачок
- BA E-0080** **Стоп розчин**– Готовий до використання
 Зміст: 0,25 М сірчаної кислоти
 обсяг: **STOP-SOLN** 3 x 12 мл/флакон, світло-сірий ковпачок
 Небезпеки
 ідентифікація
-  H290 Може викликати корозію металів.
- BA E-0131** **Мікротитрувальні стріпи адреналіну**– Готовий до використання
 Зміст: 1 x 96-лунковий (12x8) мікролунковий планшет з антигенним покриттям у синьому
 пакеті, що закривається, з
ADR MN осушувачем
- BA E-0231** **Мікротитрувальні стріпи норадреналіну**– Готовий до
 використання
 Зміст: 1 x 96-лунковий (12x8) мікролунковий планшет з антигенним покриттям у
 жовтому **NAD NMN** пакеті, що закривається, з
 осушувачем
- BA E-0331** **Дофамінові мікротитрувальні стріпи**– Готовий до використання
 Зміст: **DOP** 1 x 96-лунковий (12x8) мікролунковий планшет з антигенним покриттям у
 зеленому пакеті, що закривається, із
 осушувачем
- BA E-6110** **ADR-AS** **Антисироватка адреналіну**– Готовий до використання
 Зміст: Кролячі антиадреналінові антитіла синього кольору
 обсяг: 1 x 6 мл/флакон, синій ковпачок
- BA E-6210** **NAD-AS** **Норадреналінова антисироватка**– Готовий до використання
 Зміст: Кроляче антинорадреналінове антитіло жовтого кольору
 обсяг: 1 x 6 мл/флакон, жовтий ковпачок
- BA E-6310** **DOP-AS** **Антисироватка дофаміну**– Готовий до використання
 дійсний
 Зміст: Кролячі антидопамові антитіла зеленого кольору
 обсяг: 1 x 6 мл/флакон, рк зелений ковпачок
- BA E-6612** **ACYL-REAG** **Реагент ацилювання**– Готовий до використання
 Зміст: Реагент ацилювання в ДМСО
 обсяг: 1 x 3 мл/флакон, білий ковпачок
- BA R-0050** **ADJUST-BUFF** **Буфер коригування**– Готовий до використання
 Зміст: TRIS буфер
 обсяг: 2 x 4 мл/флакон, зелений ковпачок
- BA R-6611** **ACYL-BUFF** **Буфер ацилювання**– Готовий до використання
 Зміст: Буфер з легким лужним рН для ацилювання
 обсяг: 1 x 20 мл/флакон, білий ковпачок
- BA R-6613** **ASSAY-BUFF** **Буфер для аналізу**– Готовий до використання
 Зміст: 1 М соляна кислота та безртутний консервант
 обсяг: 1 x 6 мл/флакон, світло-сірий ковпачок
- BA R-6614** **COENZYME** **Коензим**– Готовий до використання
 Зміст: S-аденозил-L-метіонін
 обсяг: 1 x 4 мл/флакон, фіолетовий ковпачок

BA R-6615 фермент– Ліофілізований

Зміст: Катехол-О-метилтрансфераза
6 флаконів, рожева
обсяг: ковпачок

BA R-6617 Буфер екстракції– Готовий до використання

Зміст: Буфер, що містить карбонат
1 x 6 мл/флакон,
обсяг: коричневий ковпачок

BA R-6618 Екстракційний планшет– Готовий до використання

Зміст: 2 x 48-лункові планшети, вкриті боронатним афінним гелем, у пакеті, що закривається

BA R-6619 Хлористого-воднева кислота– Готовий до використання

Зміст: 0,025 М соляна кислота, жовтого кольору
1 x 20 мл/флакон, темно-зелений ковпачок
обсяг:

Стандарти і контролю – готові до використання

Кат.№.	Компонент	Колір/ Ковпачок	Концентрація нг/мл			Концентрація нмоль/л			Обсяг/ флакон
			ADR	NAD	DOP	ADR	NAD	DOP	
BA E-6601	STANDARD A	Білий	0	0	0	0	0	0	4 мл
BA E-6602	STANDARD B	Св.жовтий	1	5	10	5.5	30	65	4 мл
BA E-6603	STANDARD C	Помаранч.	4	20	40	22	118	261	4 мл
BA E-6604	STANDARD D	Темно синій	15	75	150	82	443	980	4 мл
BA E-6605	STANDARD E	Св.сірий	50	250	500	273	1,478	3,265	4 мл
BA E-6606	STANDARD F	Чорний	200	1,000	2,000	1,092	5,910	13,060	4 мл
BA E-6609	STANDARD A/B	Св.пурпур	–	–	4.5	–	–	29	4 мл
BA E-6651	CONTROL 1	Св.сірий	Зверніться до КЯ сертифікату для очікуваних значень та прийняттого діапазонці						4 мл
BA E-6652	CONTROL 2	Темо черв.							4 мл

Перетворення Адреналін (нг/мл) x 5,46 = адреналін (нмоль/л)
Норадреналін (нг/мл) x 5,91 = норадреналін (нмоль/л)
Дофамін (нг/мл) x 6,53 = Дофамін (нмоль/л)

Зміст: Кислий буфер з безртутним стабілізатором, з додаванням певної кількості адреналіну, норадреналіну і дофаміну

⚠ *для визначення дофаміну в плазмі обов'язковий додатковий Стандарт A/B

4.2 Додаткові матеріали та обладнання необхідні, але не входять до набору

- Калібровані прецизійні піпетки для дозування об'ємів від 10 до 700 мкл; 1 мл
- Пристрої для миття мікропланшетів (ручні, напівавтоматичні або автоматичні)
- Рідер ІФА, здатний зчитувати поглинання при 450 нм і, якщо можливо, 620 – 650 нм
- Шейкер для мікропланшетів (амплітуда струшування 3 мм; приблизно 600 об/хв)
- Вбираючий матеріал (паперовий рушник)
- Вода (дейонізована, дистильована або надчиста)
- Вихровий змішувач

5. Відбір і зберігання зразків**плазма**

Цільну кров слід зібрати в центрифужні пробірки, що містять EDTA як антикоагулянт, і центрифугувати відповідно до інструкцій виробника відразу після збору. У разі гемолітичних, жовтяничних або ліпемічних проб див. 2.2.1.

Зберігання: до 6 годин при 2 – 8 °С, більш тривалий термін (до 6 місяців) при -20 °С.

Слід уникати повторного заморожування та розморожування.

сеча

Можна використовувати спонтанну сечу або 24-годинну сечу, зібрану в пляшку, що містить 10-15 мл 6 М HCl. Якщо використовується 24-годинна сеча, запишіть загальний об'єм зібраної сечі.

Зберігання: до 48 годин при 2 – 8 °С, до 24 годин при кімнатній температурі, тривалий час (до 6 місяців) при -20 °С. Слід уникати повторного заморожування та розморожування. Уникайте впливу прямих сонячних променів.

6. Процедура аналізу

Дайте всім реагентам нагрітися до кімнатної температури та ретельно перемішайте, обережно перевертаючи перед використанням. Рекомендується повторювати визначення. Рекомендується пронумерувати стріпи мікропланшета перед використанням, щоб уникнути будь-якої плутанини.

Зв'язування антисироватки і кон'югату ферменту, а також активність ферменту залежать від температури. Чим вища температура, тим вищими будуть показники поглинання. Змінний час інкубації матиме подібний вплив на абсорбцію. Оптимальна температура під час проведення імуноферментного аналізу становить 20–25 °С.

6.1 Приготування реактивів

Промивний буфер

Розведіть 20 мл концентрату промивного буфера водою (дейонізованою, дистильованою або ультрачистою) до кінцевого об'єму 1000 мл.

Зберігання: 2 місяці при 2 – 8 °С

Розчин ферменту

Розчиніть вміст флакона з позначкою «Ензим» 1 мл води (дейонізованої, дистильованої або ультрачистої) і ретельно перемішайте. Додайте 0,3 мл коензиму, а потім 0,7 мл коригувального буфера. Загальний об'єм розчину ферменту 2,0 мл.

⚠ *Розчин ферменту необхідно приготувати свіжим перед аналізом (не раніше ніж за 10-15 хвилин).
Викинути після використання!*

Стріпи для мікротитрування адреналіну, стріпи для мікротитрування норадреналіну та стріпи для мікротитрування дофаміну

У рідкісних випадках залишки блокуючого та стабілізуючого реагенту можна побачити в лунках у вигляді маленьких білих точок або ліній. Ці залишки не впливають на якість продукту.

Реагент ацилювання

Реагент для ацилювання (ВА Е-6612) має температуру замерзання 18,5 °С. Щоб переконатися, що реагент ацилювання є рідким під час використання, перед використанням необхідно переконатися, що реагент ацилювання досяг кімнатної температури та утворює гомогенний розчин без кристалів.

6.2 Підготовка зразків, екстракція та ацилювання

⚠ **для визначення дофаміну в плазмі обов'язковий додатковий Стандарт А/В!*

1. Внесіть 10 мкл стандартів, контролів, зразків сечі та 300 мкл зразків плазми у відповідні лунки планшета для екстракції.
2. Додайте 250 мкл води (дейонізованої, дистильованої або ультрачистої) до лунок зі стандартами, контролем і зразками сечі.
3. Внесіть 50 мкл буфера для аналізу в усі лунки.
4. Внесіть 50 мкл екстракційного буфера в усі лунки.
5. Накрийте планшет клейкою фольгою та інкубуйте 30 хв при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
6. Зняти фольгу. Спорожніть планшет та промокніть насухо, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
7. Внесіть піпеткою 1 мл промивного Буфера в усі лунки. Інкубуйте планшет протягом 5 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв). Очистіть планшет та промокніть, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
8. Внесіть ще 1 мл промивного буфера в усі лунки. Інкубуйте планшет протягом 5 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв). Очистіть планшет та промокніть, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
9. Внесіть 150 мкл буфера для ацилювання в усі лунки.
10. Внесіть 25 мкл ацилюючого реагенту в усі лунки.
11. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
12. Очистіть планшет та промокніть, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
13. Внесіть 1 мл промивного буфера в усі лунки. Інкубуйте планшет протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв). Очистіть планшет та промокніть, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
14. Внесіть 175 мкл соляної кислоти в усі лунки.
15. Накрийте планшет клейкою плівкою. Інкубуйте 10 хв при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв). Зніміть фольгу та видаліть.

⚠ **Не зливайте супернатант після цього!**

Для наступного ІФА потрібні такі об'єми супернатанту:

Адреналін	100 мкл	Норадреналін	20 мкл
Дофамін (норми + сеча)	25 мкл	Дофамін (плазма)	50 мкл

6.3 ІФА на адреналін

1. Внесіть 25 мкл ферментного розчину (див. 6.1) в усі лунки мікротитраційних стріпів адреналіну.
2. Внесіть 100 мкл екстрагованих стандартів, контролів і зразків у відповідні лунки.
3. Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
4. Внесіть 50 мкл відповідної адреналінової антисироватки в усі лунки та накрийте планшет клейкою фольгою.
5. Інкубуйте протягом 2 годин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
6. Зняти фольгу. Викиньте або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 3 рази, додавши 300 мкл промивного буфера, викинувши вміст і висушивши кожного разу, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
7. Внесіть 100 мкл ферментного кон'югату в усі лунки.
8. Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
9. Видаліть або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 3 рази, додавши 300 мкл промивного буфера, видаліть вміст і промокніть насухо щоразу, постукуючи перевернутим планшетом об абсорбуючий матеріал.
10. Внесіть 100 мкл субстрату в усі лунки та інкубуйте протягом 25 ± 5 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв). ⚠ Уникайте впливу прямих сонячних променів!
11. Додайте 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку та струсіть планшет для мікротитрації, щоб забезпечити однорідний розподіл розчину.
12. Прочитайте поглинання розчину в лунках протягом 10 хвилин, використовуючи пристрій для зчитування мікропланшетів, налаштований на 450 нм (якщо є, рекомендована референтна довжина хвилі від 620 нм до 650 нм).

6.4 ІФА з норадреналіном

1. Внесіть 25 мкл ферментного розчину (див. 6.1) в усі лунки норадреналінових мікротитраційних стріпів.
2. Внесіть 20 мкл екстрагованих стандартів, контролів і зразків у відповідні лунки.
3. Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
4. Внесіть 50 мкл антисироватки до норадреналіну в усі лунки та накрийте планшет клейкою фольгою.
5. Інкубуйте протягом 2 годин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
6. Зняти фольгу. Видаліть або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 3 рази, додавши 300 мкл промивного буфера, видаливши вміст і висушивши кожного разу, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
7. Внесіть 100 мкл ферментного кон'югату в усі лунки.
8. Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
9. Викиньте або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 3 рази, додавши 300 мкл промивного буфера, викинувши вміст і промокнувши щоразу насухо, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
10. Внесіть 100 мкл субстрату в усі лунки та інкубуйте протягом 25 ± 5 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв). ⚠ Уникайте впливу прямих сонячних променів!
11. Додайте 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку та струсіть планшет для мікротитрації, щоб забезпечити однорідний розподіл розчину.
12. Прочитайте поглинання розчину в лунках протягом 10 хвилин, використовуючи пристрій для зчитування мікропланшетів, налаштований на 450 нм (якщо є, рекомендована еталонна довжина хвилі від 620 нм до 650 нм).

6.5 ІФА на дофамін

1. Прокачайте 25 мкл ферментного розчину (див. 6.1) у всі лунки дофамінових мікротитраційних стріпів.
2. Внесіть 25 мкл екстрагованих стандартів, контролів, зразків сечі та 50 мкл екстрагованих зразків плазми у відповідні лунки.
3. До стандартів, контролів і зразків сечі додайте 25 мкл соляної кислоти.
4. Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
5. Прокачайте 50 мкл дофамінової антисироватки в усі лунки та накрийте планшет клейкою фольгою.
6. Інкубуйте протягом 2 годин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв).
7. Зняти фольгу. Викиньте або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 3 рази, додавши 300 мкл промивного буфера, видаливши вміст і висушивши кожного разу, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
8. Внесіть 100 мкл ферментного кон'югату в усі лунки.
9. Видавіть або аспіруйте вміст лунок. Промийте планшет 3 рази, додавши 300 мкл буфера Waswith,
10. Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (20–25°С) в шейкері (прибл. 600 обертів за хвилину). Видаляючи вміст і щоразу висушуйте і промокніть, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
11. Внесіть 100 мкл субстрату в усі лунки та інкубуйте протягом 25 ± 5 хвилин при кімнатній температурі (20–25 °С) на шейкері (приблизно 600 об/хв). ⚠ Уникайте впливу прямих сонячних променів!
12. Додайте 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку та струсіть планшет для мікротитрації, щоб забезпечити однорідний розподіл розчину.
13. Прочитайте поглинання розчину в лунках протягом 10 хвилин, використовуючи пристрій для зчитування мікропланшетів, налаштований на 450 нм (якщо є, рекомендована еталонна довжина хвилі від 620 нм до 650 нм).

7. Підрахунок результатів

Діапазон вимірювання		Адреналін	Норадреналін	Дофамін
	сеча		0,7 – 200 нг/мл	2,5 – 1000 нг/мл
плазма		18 – 6667 пг/мл	93 – 33333 пг/мл	75 – 33333 пг/мл

Стандартні криві отримують шляхом побудови показань абсорбції (обчисліть середню абсорбцію) стандартів (лінійна, вісь ординат) проти відповідних стандартних концентрацій (логарифмічна, вісь x). Використовуйте нелінійну регресію для підгонки кривої (наприклад, 4-параметричну, Маркварда).

⚠ Цей аналіз є конкурентоспроможним. Це означає: значення OD зменшуються зі збільшенням концентрації аналіту. Значення ОП, знайдені нижче стандартної кривої, відповідають високим концентраціям аналіту в зразку, і їх слід повідомляти як позитивні.

Зразки та контролі сечі

Концентрації зразків сечі та контролів можна зчитати безпосередньо зі стандартної кривої. Обчисліть 24-годинну екскрецію для кожного зразка сечі: $\text{мкг}/24 \text{ год} = \text{мкг}/\text{лхл}/24 \text{ год}$.

Зразки плазми

Зчитані концентрації адреналіну та норадреналіну у зразках плазми необхідно розділити на 30. Зчитані концентрації дофаміну в зразках плазми необхідно розділити на 60.

Перетворення

Адреналін (нг/мл) $\times 5,46 =$ адреналін (нмоль/л)
Норадреналін (нг/мл) $\times 5,91 =$ норадреналін (нмоль/л)
Дофамін (нг/мл) $\times 6,53 =$ Дофамін (нмоль/л)

Очікувані контрольні значення

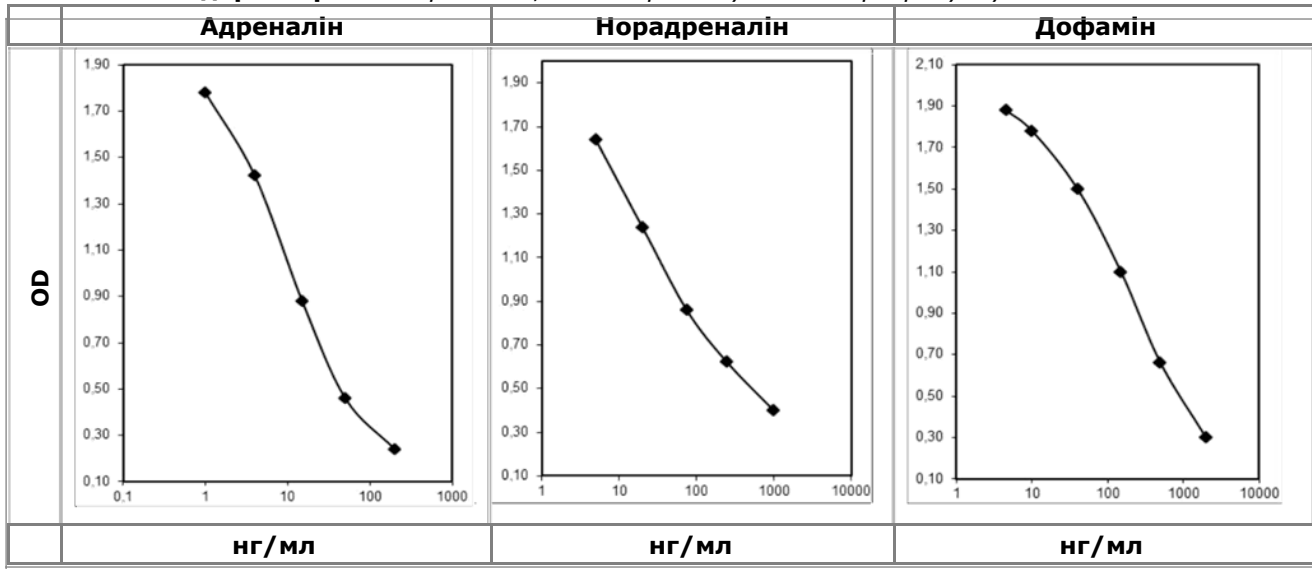
Настійно рекомендується, щоб кожна лабораторія визначала власні нормальні та ненормальні значення.

	Адреналін	Норадреналін	Дофамін
24-годинна сеча	< 20 мкг/день (110 нмоль/день)	< 90 мкг/день (535 нмоль/день)	< 600 мкг/день (3900 нмоль/день)
плазма	< 100 пг/мл	< 600 пг/мл	< 100 пг/мл

7.1 Контроль якості

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до національних норм. Використовуйте контроль як на нормальному, так і на патологічному рівнях. Набір або інші комерційні засоби контролю повинні відповідати встановленим довірчим межах. Межі достовірності контролів набору надруковані у звіті про контроль якості.

7.2 Типові стандартні криві Приклади, не використовувати для розрахунку!



8. Характеристики аналізу

Аналітична Чутливість	LOD		Адреналін	Норадреналін	Дофамін
		Сеча (нг/мл)	0,9	1,7	2,5
	LOQ	Плазма (пг/мл)	10	36	49
		Сеча (нг/мл)	0,7	2,5	4,8
		Плазма (пг/мл)	18	93	75

Аналітична специфічність (перехресна реактивність)	Речовина	Перехресна реактивність (%)		
		Адреналін	Норадреналін	Дофамін
	Похідний адреналін	100	0,08	0,02
Похідне норадреналіну	0,13	100	6,4	
Похідний дофаміну	< 0,01	0,03	100	
Метанефрин	0,18	< 0,01	< 0,01	
Норметанефрин	< 0,01	0,16	0,01	
3-метокситирамін	< 0,01	< 0,01	0,49	
3-метокси-4-гідроксифенілгліколь	< 0,01	< 0,01	< 0,01	
Тирамін	< 0,01	< 0,01	0,18	
Фенілаланін, Кофеїнова кислота, L- Дофа, гомованілова кислота, тирозин, 3-метокси-4-гідроксимигдальна кислота	< 0,01	< 0,01	< 0,01	

Точність							
Сеча під час аналізу (n = 60)				Плазма під час аналізу (n = 60)			
	Зразок	Діапазон (нг/мл)	CV(%)		Зразок	Діапазон (пг/мл)	CV(%)
Адреналін	1	6,2 ± 1,1	17,4	Адреналін	1	64,7 ± 15,9	24,7
	2	21,4 ± 2,7	12,4		2	258 ± 32,5	12,7
	3	59,4 ± 7,8	13,1		3	948 ± 105	11,0
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
Дофамін	1	82 ± 16,1	19,7	Дофамін	1	75 ± 22	29,8
	2	253 ± 41,1	16,3		2	353 ± 86	24,4
	3	714 ± 67	9,4		3	1187 ± 293	24,9

Точність

Між аналізами сеча (n = 33)				Плазма між аналізами (n = 18)			
	Зразок	Діапазон (нг/мл)	CV (%)		Зразок	Діапазон (пг/мл)	CV (%)
Адреналін	1	5,2 ± 0,9	17.9	Адреналін	1	76,4 ± 11,1	14.5
	2	17,8 ± 2,1	11.7		2	247 ± 27,5	11.1
	3	54,2 ± 6,6	12.1		3	771 ± 101	13.1
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
Дофамін	1	79,3 ± 18,8	23.7	Дофамін	1	238 ± 67,0	28.2
	2	222 ± 27,0	12.1		2	1072 ± 201	18.8
	3	630 ± 69,0	11.0		3	3449 ± 491	14.2

Лінійність			Серійне розведення до	Діапазон (%)	Середнє (%)
			Адреналін	сеча	1:512
	Адреналін	плазма	1:512	94 – 115	105
	Норадреналін	сеча	1:512	100 – 127	112
		плазма	1:512	102 – 125	112
	Дофамін	сеча	1:512	83 – 126	104
		плазма	1:512	85 – 132	106

Відновлення			Середнє (%)	Діапазон (%)	Діапазон
			Адреналін	сеча	106
	Адреналін	плазма	105	88 – 117	9,1 – 4268 пг/мл
	Норадреналін	сеча	103	91 – 113	58,6 – 260 нг/мл
		плазма	87	75 – 107	51 – 14 251 пг/мл
	Дофамін	сеча	110	101 – 124	225 – 1306 нг/мл
		плазма	89	84 – 92	57,4 – 16 054 пг/мл

9. Посилання/Література

- (1) Дай та ін. Зв'язок рівня адреналіну в плазмі з чутливістю до інсуліну у метаболічно здорових людей, але страждають ожирінням. *Вегетативна нейронаука: базові та клінічні*, 167:66-69 (2012)
- (2) Грубер та ін. Підвищення рівня дофаміну пов'язане з цГМФ і гомоцистеїновим шляхом у жінок з мігренню. *Головний біль* 50:109 -116 (2010)
- (3) Мобіне та ін. Кардіоміопатія, спричинена феохромоцитомою, модулюється синергетичними ефектами факторів, що секретуються клітинами. *Кровообіг: Серцева недостатність*, 2(1):121-128 (2009)

Щоб отримати оновлену літературу чи будь-яку іншу інформацію, зверніться до місцевого постачальника.

Символи:

	Температура зберігання		Виробник		Містить достатньо для <n> тестів
	Термін придатності		Код партії		Для діагностики in vitro використовувати тільки!
	Зверніться до інструкцій для використання		Зміст		Маркування CE відповідність
	Обережно		Каталожний номер		Дистриб'ютор
	Дата виготовлення				