



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 по застосуванню 2-MET сеча ELISA перша лінія

BA E-8600



96

IVD

1. Введення

1.1 Застосування і принцип випробування

Імуноферментний для кількісного визначення метанефріна і норметанефріна в сечі
Під час підготовки зразка метанефріна (metadrenaline) та норметанефріна (Normetadrenaline) є кількісно ацилюючим.

Подальше конкурентний ELISA використовує формат мікропланшетів. Антиген пов'язаний з твердою речовиною фази мікропланшета. Ацильовані стандарти, контролю і зразки і тверда фаза, зв'язані аналізом, конкурують за обмежену кількість сайтів зв'язування антитіл. Після того як система знаходиться в рівновазі, вільний антиген і вільні комплекси антиген-антитіло видаляються промиванням. Антитіло, пов'язане з твердою фазою виявляється за допомогою анти-кролячого IgG кон'югату пероксидази з використанням ТМБ як субстрату. Реакцію контролюють при 450 нм.

Кількісне визначення невідомих зразків досягається шляхом порівняння їх оптичної щільності з калібрувальною кривою, побудованою з відомими стандартними концентраціями.

Анти- метанефрину антитіла, які використовуються в даному наборі тільки розпізнають біологічно активні L- форми Метанефрину. Комерційно доступні синтетичний метанефрін завжди є сумішшю D- і L-форм. Співвідношення між цими двома формами сильно відрізняється від партії до партії. Це має важливе значення якщо синтетичний Метанефрін використовується для збагачення нативних зразків. Як тільки близько 50% синтетичного метанефрину - в Lportion- буде виявлено за допомогою цього набору, пікові зразки будуть недооцінені. Тому нативні зразки, що містять виключно L-форми слід використовувати.

1.2 Клінічне застосування

Метанефрін і норметанефрін є метаболітами катехоламінів адреналіну і норадреналіну, відповідно. Вони метаболізуються до ванілілміндалінової кислоти або виводяться з організму з сечею. У хворих з феохромоцитомою або іншими пухлинами, отриманими з нейроендокринних клітин показують підвищені сечові рівні загального змісту метанефринів. Як секреція катехоламінів з нейроендокринних клітин може показати високі варіації, зразки сечі, зібрані протягом 24 годин, використовуються для усереднення цих коливань.

Терапевтичні наслідки не повинні ґрунтуватися на результатах лабораторних аналізів поодиночі, навіть якщо всі результати випробувань знаходяться в угоді з деталями, як в пункті "Процедурні запобіжних заходів, керівні принципи і попередження". Будь-які лабораторні результати є лише частиною загальної клінічної картини пацієнта.

Тільки в тих випадках, коли лабораторні результати знаходяться в задовільній згоді із загальною клінічною картиною пацієнта він може бути використаний для терапевтичних наслідків.

Сам тест результат ніколи не повинен бути єдиним фактором, що визначає для отримання будь-яких терапевтичних наслідків.

2. Запобіжні заходи процедури, рекомендації, попередження та обмеження

2.1 . Запобіжні заходи процедури, рекомендації і попередження

(1) Цей комплект призначений тільки для професійного використання. Користувачі повинні мати глибоке розуміння цього протоколу для успішного використання цього комплекту. Тільки інструкція аналізу, яка входить в набір є дійсною, і повинна бути використана для запуску аналізу. Надійна робота буде досягнута тільки шляхом суворого і ретельного процесу приєднання до інструкції.

(2) Цей тест був апробований для певного типу зразка, як вказано в *Застосування і принцип випробування* (зверніться до Розділ 1). Будь-яке використання не за прямим призначенням цього комплекту знаходиться в відповідальності користувача і виробник не може нести відповідальність.

(3) Принципи належної лабораторної практики (GLP) повинні бути дотримані.

- (4) Для того, щоб зменшити вплив потенційно шкідливих речовин, носити халати, одноразові захисні рукавички і захисні окуляри, де необхідно.
- (5) Всі реагенти набору і зразки повинні бути доведені до кімнатної температури і обережно, але ретельно перемішані перед використанням. Уникайте повторного заморожування і розморожування реагентів і зразків.
- (6) Для розведення або відновлення цілей, використовують деіонізовану дистильовану або ультра-чисту воду.
- (7) мікропланшет містить смужки (стріпи), що відламуються. Невикористані лунки повинні зберігатися при температурі від 2 ° C до 8 ° C в запечатаному пакеті з фольги чохол з осушувачем і використовується в тримачу, що постачається.
- (8) Дублікат визначення зразка настійно рекомендується, щоб бути в змозі ідентифікувати потенційні помилки прокапування.
- (9) Після початку аналізу всі кроки повинні бути завершені без перерви. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої готові у відповідний час.
- (10) Інкубаційний час дійсно впливає на результати. Всі лунки повинні бути оброблені в тому ж порядку і в такі ж самі проміжки часу.
- (11) Для того, щоб уникнути перехресного забруднення реагентів, використовувати нові одноразові наконечники піпеток для дозування кожного реагенту, зразку, стандарту і контролю.
- (12) Стандартна крива повинна бути встановлена для кожного прогону.
- (13) Контролі повинні бути включені в кожному циклі і падіння в межах встановлених лімітів довіри. Ліміт довіри наведений в QC-Report.
- (14) Не слід змішувати компоненти набору з різними номерами партій в аналізі і не використовуйте реагенти після строку придатності, вказаному на етикетці
- (15) Уникайте контакту з Стоп-розчином, що містить 0,25 M H₂SO₄. Це може викликати роздратування шкіри і опіки. У разі контакту з очима або шкірою, змити водою відразу.
- (16) ТМВ субстрат має подразнюючу дію на шкіру та слизову оболонку. У разі можливого контакту, промийте очі рясним обсягом води і шкіру з милом і великою кількістю води. Промити забруднені об'єкти перед їх використанням.
- (17) Для отримання інформації про небезпечні речовини, що входять в комплект, будь ласка, зверніться до Паспорту безпеки (MSDS). Паспорт безпеки для даного продукту доступний безпосередньо на сайті виробника або за запитом.
- (18) Очікувані еталонні значення, представлені в цьому тесті інструкції є лише орієнтовними. Рекомендується кожній лабораторії встановлювати свої власні інтервали.
- (19) Результати, отримані за допомогою цього набору не слід сприймати як єдину підставу для будь-якого терапевтичного наслідку. (наприклад, ліки до запланованої операції), але повинні бути співвіднесені з іншими діагностичними і клінічними спостереженнями.
- (20) набір реагентів слід розглядати як небезпечні відходи і утилізувати відповідно до національних правил.

2.2 Обмеження

Будь-яке невідповідне поводження зі зразками або модифікації цього тесту можуть вплинути на результат.

2.2.1 Впливаючі речовини

24-годинна сеча

Будь-ласка, зверніть увагу на *збір і зберігання зразків* ! Якщо відсоток від кінцевої концентрації кислоти занадто високий, буферна ємність Ацилірованого буфера є недостатня. Як наслідок метанефрін не буде ацилірован адекватно.

2.2.2 Вплив лікарських засобів

Не відомі речовини (ліки), прийом яких впливає на визначення рівня Метанефрину в зразку.

2.2.3 Висока доза Хук ефект.

Хук ефект не спостерігався в цьому аналізі

4. Матеріали

4.1 Зміст набору

BA D-0023 Reac- Tubes реакційних пробірок - готовий до використання.

Зміст: Реакційні пробірки в зачиненому пакеті.

Обсяг : 2 x 50 пробірок

BA E-0030 Wash Concentrate **50x** Концентрат промивного буфера - Концентрований 50x

Зміст: Буфер з неіоногенного детергента і фізіологічного рН

Обсяг : 1 x 20 мл / флакон, світло-фіолетовий ковпачок

BA E-0045 Conjugate ферментний кон'югат – готовий до використання

Зміст: Коза анти-кролячі імуноглобуліни, кон'юговані з пероксидазою

Обсяг: 1 x 12 мл / флакон, червоний ковпачок

BA E-0055 Substrate субстрат - готовий до використання:

Зміст: хромогенний субстрат, що містить тетраметілбензідин , субстрат та пероксид водороду

Обсяг: 1 x 12 мл / флакон, чорний ковпачок

BA E-0080 Stop Solution Стоп-розчин - Готовий до використання

Зміст: 0,25 М сірчаної кислоти

Обсяг: 1 x 12 мл / флакон, світло-сірий ковпачок

BA E-0131 Adr Mn метанефрину мікропланшет - Готовий до використання

Зміст : 1 x 96 лунок (12x8) антиген з попереднім покриттям планшета в багаторазовому синьому мішечку з осушувачем

BA E-0231 Adr NorMn норметанефрину мікропланшет - Готовий до використання

Зміст : 1 x 96 лунок (12x8) антиген з попереднім покриттям планшета в багаторазовому жовтому мішечку з осушувачем

BA E-8410 MN-As метанефрину антисироватки - Готовий до використання

Зміст: Кролик анти-метанефрину антитіло, синій колір

Обсяг: 1 x 12 мл / флакон, синій ковпачок

BA E-8510 NMN-As Норметанефрину антисироватки - Готовий до використання

Зміст: Кролик анти-метанефрину антитіла, жовтий колір

Обсяг: 1 x 12 мл / флакон, жовтий ковпачок

Стандарти і контролі – Готові до використання

Кат №	компонент	Колір/ковпачок	Концентрація нг/мл (=мкг / л) MN	Концентрація нмоль/л NMN	Концентрація нг/мл (=мкг / л) MN	Концентрація нг/мл (=мкг / л) MN	Обсяг/ флакон
BA R-8601	Стандарт А	білий	0	0	0	0	4 мл
BA R-8602	Стандарт В	Світло-жовтий	20	30	101	164	4 мл
BA R-8603	Стандарт С	оранжевий	60	90	304	491	4 мл

BA R-8604	Стандарт D	Темно-синій	200	300	1014	1638	4 мл
BA R-8605	Стандарт E	Світло-сірий	600	900	3042	4914	4 мл
BA R-8606	Стандарт F	чорний	2000	3000	10140	16380	4 мл
BA R-8651	Контроль 1	Світло-зелений	Зверніться до QC-звіту для очікуваного значення і прийнятного діапазону!				4 мл
BA R-8652	Контроль 2	Темно-червоний					4 мл

Перетворення: метанефрину (нг / мл) x 5,07 =метанефрину (нмоль / л)
норметанефрину (нг / мл) x 5,07 =норметанефрину (нмоль / л)

Зміст: Кислотний буфер з безртутними консервантами, з певною кількістю метанефрину та норметанефрину.

BA R-0012 Acyl Conc Концентрат ацилірованого реагенту –концентрований

Зміст: Концентрований ацилірований реагент.

Обсяг: 1 x 0,5 мл /флаконт

Ідентифікація біологічної небезпеки :

H 314 викликає серйозні опіки шкіри і очей . Небезпечно.

BA R-0075 Acyl Diluent Ацилірований Розчинник - готовий до використання

Зміст: диметилсульфоксид

Обсяг: 1 x 4 мл / флакон, темно-сірий ковпачок

BA R-8611 Acyl Buffer Ацилірований Буфер - готовий до використання

Зміст: ТРИС буфер

Обсяг: 1 x 30 мл / флакон, білий ковпачок

BA R-8619 HCL соляна кислота - Готова до використання

Зміст: 0,25 М соляної кислоти, жовтий колір

Обсяг: 1 x 30 мл / флакон, темно-зелений ковпачок

4.2 Додаткові матеріали та обладнання, необхідні, але не надані в наборі

- калібровані прецизійні піпетки для розподілу обсягів між 10 - 600 мкл; 1.2 - 3 мл
 - пристрій для промивання планшет (ручний, напівавтоматичний або автоматичний)
 - ELISA рідер здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм і, якщо це можливо 620 - 650 нм
 - абсорбуючий матеріал (паперові рушники)
 - Вода (деіонізована, дистильована або надчиста)
 - вортекс змішувач
 - терморегульована водяна баня (90 ° c) або аналогічний пристрій для нагріву
- Аналіз може бути виконаний з або без струшування. Якщо мікропланшетний шейкер використовується, він повинен мати наступні характеристики: амплітуда струшування 3 мм; прибіл. 600 об/хв

5. Збір зразків і зберігання

Спонтанна або 24-годинна сеча, зібрана в ємність, що містить 10 - 15 мл 6 М НСІ, має бути використана. Визначити загальний обсяг сечі виділеної протягом періоду 24 год для розрахунку результатів.

Зберігання: протягом більш тривалих періодів (до 6 місяців) при -20°C .

Уникайте повторних циклів заморожування і відтавання . Уникайте впливу прямого сонячного проміння

6. Процедура аналізу

Довести всі реагенти до кімнатної температури і перед використанням ретельно перемішайте за допомогою обережного перевертання. Пронумеруйте Реакційні пробірки відповідно.

Дворазові вимірювання рекомендовані.

Пробопідготовки (гідроліз і ацилювання) однакова для обох метанефрина і Норметанефрина аналізу і повинно бути зроблено тільки один раз

Зв'язування антитіл і кон'югатів ферменту, а також активність ферменту, використовуваного залежить від температури, а значення поглинання можуть змінюватися, якщо не використовується термостат. Чим вище температура, тим вище буде значення поглинання. Величини абсорбції також залежать від часу інкубації. Оптимальна температура під час імуноферментного аналізу становить від $20 - 25^{\circ}\text{C}$. В разі переповнення, читати оптичну щільність розчину в лунках протягом 10 хвилин, використовуючи зчитувач (рідер) мікропланшету встановлений на 405 нм.

Підготовка реагентів

Промивний буфер

Розвести 20 мл промивного буфер концентрату з водою (деіонізованою, дистильованою або надчистою) до кінцевого обсягу 1000 мл.

Зберігання: 1 місяць при $2 - 8^{\circ}\text{C}$

Ацилюваний розчин

Перед підготовкою ацилюваного розчину переконайтеся, що ацилюваний розчинник (ВА R-0075) досяг кімнатної температури ($\geq 20^{\circ}\text{C}$) і утворює гомогенний, свobodний від кристалів розчин.

Розвести концентрат ацилюваного реагенту (ВА R-0012) 1 + 60 з ацилюваним розчинником в склянці або поліпропіленовому флаконі.

Ацилюваний концентрат	10 мкл	20 мкл	25 мкл	50 мкл
Ацилюваний розчинник	600 мкл	1.2 мл	1.5 мл	3 мл

Ацилюваний Розчин повинен бути приготовлений безпосередньо перед аналізом (не більше ніж за 60 хвилин). Викинути після використання!

6.2 Підготовка проб і ацилювання

гідроліз

1. Прокапати 25 мкл стандартів, контролів і зразків сечі у відповідні пробірки реакції
2. Додати 250 мкл соляної кислоти во всіх пробірок.
3. Ретельно (вортекс) змішайте і гідроліз протягом 30 хв при 90°C .
4. Охолодити пробірки до кімнатної температури.

Для виміру тільки вільного метанефрину та вільного норметанефрину залиште пункти 3 і 4.

Ацилювання.

1. Внесіть 250 мкл ацилюваного буфера в усі пробірки.
2. Додайте 25 мкл ацилюючого реагенту (див 6.1) для всіх пробірок.

3. Ретельно змішати (вортекс) і ацильовати протягом 15 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) .

4. Додати 2,5 мл води (деіонізованої, дистильованої або надчистої) для всіх пробірок. Візьміть 25 мкл ацильованих стандартів, контролів і зразків сечі для метанефрину та норметанефрину ELISA.

6,3 метанефрин ELISA

Використання шейкера не обов'язково. Альтернативний протокол без шейкера виділений в *italic* и затіненій в сіре.

1. Прокапати 25 мкл ацильованих стандартів, контролів і зразків до відповідних лунок мікропланшету метанефрина.
2. Прокапати 100 мкл метанефрину антисироватки в усі лунки.
3. Інкубувати 30 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) на шейкері (близько 600 оборотів в хвилину.) *Використання без шейкера: струсіть норметанефрину мікропланшет коротко і інкубуйте на протязі 1 години при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) .*
4. Викинути або аспірувати вміст лунок. Промити пластини 3 х шляхом додавання 300 мкл промивного буфера, відкидаючи зміст і промокати сухий кожен раз, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
5. Прокапати 100 мкл ферментного кон'югату в усі лунки.
6. Інкубують протягом 15 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) на шейкері (близько 600 оборотів в хвилину.) *Використання без шейкера: інкубують протягом 15 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) .*
7. Викинути або аспірувати вміст лунок. Промити пластини 3 х шляхом додавання 300 мкл промивного буфера, відкидаючи зміст і промокати сухий кожен раз, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
8. Прокапати по 100 мкл субстрату в усі лунки.
9. Інкубувати протягом 15 ± 2 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) на шейкері (близько 600 оборотів в хвилину.) *Використання без шейкера: інкубувати протягом 15 хв ± 2 при RT (20 - 25 ° C) .* Уникайте впливу прямих сонячних променів !
10. Додайте 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку і струсіть планшет для забезпечення рівномірного розподілу в розчині.
11. Виміряти оптичну щільність розчину в лунках протягом 10 хвилин, за допомогою планшетного рідера встановленого 450 нм (при наявності еталонної довжини хвилі між 620 нм і 650 нм рекомендується) .

6,4 норметанефрин ELISA

Використання шейкера не обов'язково. Альтернативний протокол без шейкера виділений в *italic* и затіненій в сіре.

1. Прокапати 25 мкл ацильованих стандартів, контролів і зразків до відповідних лунок мікропланшету метанефрина.
2. Прокапати 100 мкл норметанефрину антисироватки в усі лунки.
3. Інкубувати 30 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) на шейкері (близько 600 оборотів в хвилину.) *Використання без шейкера: струсіть норметанефрину мікропланшет коротко і інкубуйте на протязі 1 години при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) .*
4. Видалити або аспірувати вміст лунок. Промити пластини 3 х шляхом додавання 300 мкл промивного буфера, відкидаючи зміст і промокати сухий кожен раз, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
5. Прокапати 100 мкл ферментного кон'югату в усі лунки.
6. Інкубують протягом 15 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) на шейкері (близько 600 оборотів в хвилину.) *Використання без шейкера: інкубують протягом 15 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) .*

7. Видалити або аспірувати вміст лунок. Промити пластини 3 х шляхом додавання 300 мкл промивного буфера, відкидаючи зміст і промокати сухий кожен раз, постукуючи перевернутим планшетом по абсорбуючому матеріалу.
8. Прокапати по 100 мкл субстрату в усі лунки.
9. Інкубувати протягом 15 ± 2 хв при кімнатній температурі (20 - 25 ° C) на шейкері (близько 600 оборотів в хвилину.) *Використання без шейкера: інкубувати протягом $15 \text{ хв} \pm 2$ при RT (20 - 25 ° C) .* Уникайте впливу прямих сонячних променів !
10. Додайте 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку і струсіть планшет для забезпечення рівномірного розподілу в розчині.
11. Виміряти оптичну щільність розчину в лунках протягом 10 хвилин, за допомогою планшетного рідера устанавленого 450 нм (при наявності еталонної довжини хвилі між 620 нм і 650 нм рекомендується) .

7.Розрахунок результатів

Діапазон вимірювань	Метанефрін	норметанефрін
	13-2000 нг/мл	23-3000 нг/мл

Стандартна крива виходить шляхом побудови показань оптичної щільності (розрахувати середню оптичну щільність) стандартів (лінійні, вісь у) проти відповідних стандартних концентрацій (логарифмічні, вісь х) . Використовуйте нелінійну регресію для побудови кривої (наприклад, сплайн, 4 параметр, Якіма) . Цей аналіз є конкурентний аналіз. Це означає: при ОЩ-значення зменшуються з підвищенням аналіту. ОЩ-значення, знайдені нижче стандартної кривої відповідають високій концентрації аналіту в зразку і повинні бути представлені як концентрації позитивні. Концентрації зразків і елементів управління можна зчитувати безпосередньо з стандартної кривої. Сума аналіту виводимого з організму в день (мкг / день) розраховується за формулою: концентрація зразка (в мкг / л) x обсяг сечі на добу (в л / добу) Приклад

Концентрація в досліджуваному зразку = 125 мкг / л. Кількість сечі, зібраної протягом 24 години становить 1,3 л. Тоді кількість аналізованої речовини виводимого з організму протягом одного дня буде виглядати так:

$$125 \text{ мкг / л} \times 1,3 \text{ л / день} = 162,5 \text{ мкг / день}$$

перетворення

$$\text{Метанефрін (нг / мл)} \times 5,46 = \text{метанефрін (нмоль / л)}$$

$$\text{Норметанефрін (нг/мл)} \times 5,46 = \text{норметанефрін (нмоль/л)}$$

Очікуване значення характеристики

Настійно рекомендується кожній лабораторії визначити своє власне значення характеристики.

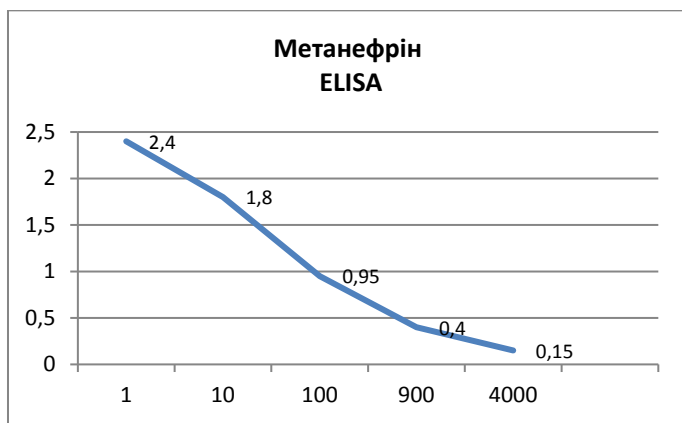
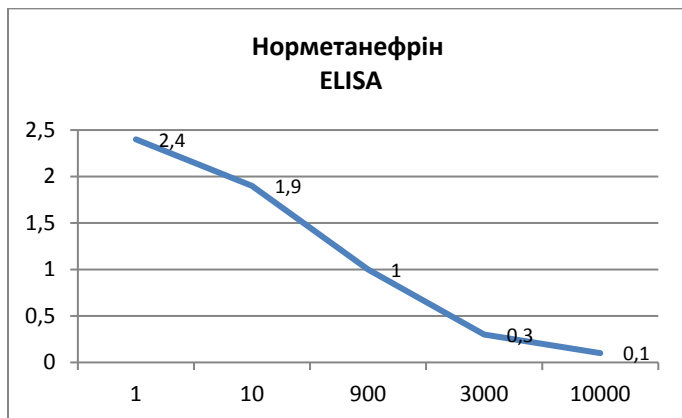
24 години сеча	Норметанефрін	метанефрін
	< 600 мкг/доба	< 350 мкг/доба

7.1 Контроль якості

Рекомендується використовувати контрольні зразки відповідно до національних правил. Використовуйте контролю як нормальних так і патологічних рівнів. Набір або інші комерційні засоби управління повинні знаходитися в межах встановленого ліміта довіри Межі контролів набору вказані на QC-Report.

7.2 Типова стандартна крива

Приклад, не слід використовувати для розрахунку!



Нг/мл

8. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

аналітична чутливість (Межа виявлення)		норметанефрін	метанефрін
	сеча	23 нг/мл	13 нг/мл

аналітична специфічність (Перехресне реактивність)	Речовина	Перехресне реактивність (%)	
		норметанефрін	метанефрін
	Дериватизованного метанефрину	0,11	100
	Дериватизованного норметанефрина	100	0,15
	Дериватизованного 3-метокситирамин	0,19	< 0.01
	адреналін	< 0.001	3,3
	Норадреналін	0,64	< 0.001
	Допамін	< 0.01	< 0.001
Ванілінова мигдальної кислоти, L-ДОФА, Гомованілінової кислота, L-тирозину, Tyramin	< 0.001	< 0.001	

Застосування		
--------------	--	--