

## EIA-1620, VMA ELISA - ВМК (Ванилилминдальная кислота)

### НАИМЕНОВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ВМК ИФА-набор разработан для количественного измерения концентрации ванилилминдальной кислоты (ВМК) в моче пациента. Для использования только в диагностике *in vitro*.

### ОБСТАНОВКА

Среди спектрофотометрических исследований наиболее широко используемая процедура была предложена Пизано и его коллегами (1) - измерение ванилина непосредственно при 360 нм. Колориметрические методы вообще страдают от мешающих соединений и большой трудоемкости, требующей многих шагов, сделанных вручную. Использование методов бумажной хроматографии (2,3) с использованием диазотированного п-нитроанилина и тонкослойной хроматографии (TLC) на силикагеле (4) рекомендовались для анализа извлеченной ВМК, но, как полагают, только ради исторического интереса. Позже, производители высоко эффективной жидкостной хроматографии (HPLC) предложили множество датчиков, включая ультрафиолетовый свет (5-7), амперметрическое обнаружение (8-11), и постколоночную реакцию (12, 13). Эти процедуры, как полагают, являются значительным усовершенствованием для полной специфичности и чувствительности анализа.

### РЕЗЮМЕ И ОБЪЯСНЕНИЯ

Катехоламины включают в себя допамин (найденный главным образом в центральной нервной системе), норметанефрин (главным образом в симпатической нервной системе) и адреналин (главным образом в мозговом веществе надпочечников). Они хранятся как неактивный комплекс. Высвобожденные катехоламины, имея короткий период полураспада, забираются симпатическими нервными окончаниями или метаболизируются печенью и почкой, а затем выводятся. Ванилилминдальная кислота (ВМК) (VMA) и 4-гидрокси-3-метокси-миндальная кислота (НММА) (ГММК) являются конечным продуктом катаболизма адреналина и метанефрина. Подсчет кислых метаболитов, долго был надежным диагностическим методом, так же как и обычно используемая последующая процедура, для феохромоцитомы и других катехоламинпродуцирующих опухолей (14-16). Распространенность феохромоцитомы составляет 0,1 – 0,2 % у пациентов с гипертонией (17, 18). У феохромоцитом есть длинный перечень ложных диагнозов из-за симптомов характерных для обменных, сердечных и желудочно-кишечных заболеваний. Они могут подражать многим другим болезням. Не обнаруженная или неправильно пролеченная, феохромоцитомы может быть фатальной. Однако, так как это - хирургическим путем излечимая болезнь, ранний диагноз по обнаружению лишнего выделения ВМК критически важен.

### ПРИНЦИП ИСПЫТАНИЯ

ВМК ИФА является твердо-фазным, связанным с ферментом, иммуносорбентным анализом (ELISA), основанный на конкуренции между ВМК, покрытым на микролунке, и между тем, который находится в моче за моноклональное антитело. Обрисованные в общих чертах шаги:

1. **Отбор проб и реакция:** образцы инкубируются в лунках с конъюгатом анти-ВМК моноклонального антитела и пероксидазы хрена.
2. **Промывка:** несвязанная ВМК и антитело, связанное с мочевой ВМК, удаляются промывкой с 0.9 % раствором NaCl.
3. **Ферментная Реакция (Образование Цвета):** количество связанной пероксидазы обратно пропорционально концентрации ВМК в образце мочи. После добавления субстрата (ТМБ) образуется синее окрашивание. Затем оно меняется на желтое после добавления Стоп-Раствора. Интенсивность его обратно пропорциональна концентрации ВМК в образце мочи или Калибраторе.
4. **Определение Абсорбции:** после добавления Стоп-раствора абсорбция измеряется при 450 нм. Прочитанные данные преобразуются в концентрации по Калибровочной кривой. (См. на схематическое описание Рис. 1),

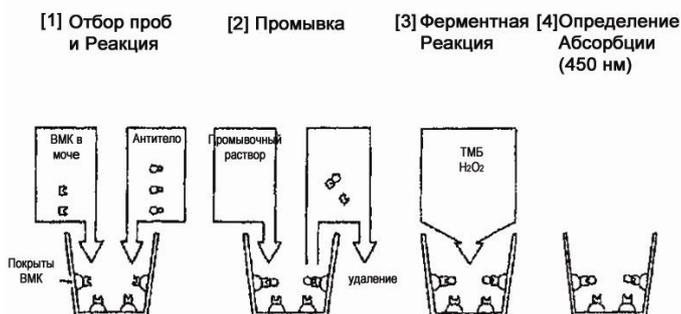


Рис.1

### СОСТАВ НАБОРА

1. Планшет с 96 микролунами.
2. Ферментный конъюгат – пероксидаза хрена, 10 мл
3. Хромогенный раствор – ТМБ, 20 мл
4. Стоп-раствор – смесь соляной и серной кислот, 20 мл
5. Набор калибраторов – 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 1; 2; 4; 8 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, 0,01 М, pH 7,4 (по 1 мл каждый)

### НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ.

1. Планшетный ридер со светофильтром на 450 нм.
2. Потенциометр с определением РН в интервале 5,0 – 10,0.
3. Дозатор с наконечниками на 10, 50 и 100 мкл.
4. Дозатор с наконечниками на 50 и 100 мкл.
5. Мерные цилиндры, 10 и 100 мл.
6. Мерные и серологические пипетки, 10 мл.
7. Одноразовые тестовые пробирки или флаконы.
8. Раствор 5N NaOH.
9. Раствор 5N HCl.
10. Вошер (рекомендуется).
11. Шейкер (рекомендуется).
12. Натрия хлорид или солевой раствор.
13. 0,01 М Фосфатно-солевой буфер, РН 7,4.

### ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

1. Подготовить 0,01 М фосфатно-солевого буфера с pH 7,4. Этот раствор надо будет использовать для растворения всех неизвестных образцов мочи перед исследованием.
2. Перед началом теста привести все образцы мочи и реагенты до комнатной температуры и хорошо их перемешать.
3. Подготовить все реагенты и образцы мочи перед началом анализа. Процедура целиком должна проходить без прерываний для получения более надежных результатов.

## EIA-1620, VMA ELISA - ВМК (Ванилилминдальная кислота)

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. EIA-1620 ВМК комплект разработан для *in vitro* только.
2. Компоненты в этом комплекте предназначены для использования как составная единица.
3. Компоненты различных лотов не должны быть смешаны.
4. Не используйте Калибраторы ВМК в этом наборе для других целей (например, ВЭЖХ).
5. Используйте новый наконечник пипетки для каждого Калибратора или образца мочи, чтобы избежать кросс-контаминации.

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить реагенты при 2-8°C в холодильнике.
2. Микролунки хранить в сухом пакетике с десикантом. Открывать пакет только при необходимости.
3. Сроки годности реагентов указаны на флаконах. Хромогенный реагент должен быть бесцветным.
4. Не допускать воздействия прямых солнечных лучей на реагенты.

### ОТБОР ПРОБ И ОБРАЩЕНИЕ С НИМИ

Суточная моча должна быть отобрана с 10 мл 6N HCl в качестве консерванта. Ночная или случайно отобранная моча должна быть окислена до pH между 2 и 3 сразу после отбора. Сделайте запись суммарного объема и оставьте 1-5 мл для анализа ВМК и общего креатинина. Все образцы должны быть охлаждены до теста. Осадите мутные образцы мочи, содержащие кристаллы или осадок.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

#### А. Подготовка реагентов

Промывочный раствор:

Растворить 9 г NaCl в 1 литре дистиллированной или деионизированной воды. Также можно использовать стандартный солевой раствор, имеющийся в открытой продаже.

#### В. Подготовка образцов

1. Взять 1 мл подкисленной мочи и перенести в одноразовую пробирку, в которой можно изменить её pH.
2. Довести pH всех образцов до значений между 6 и 9, поэтапно добавляя небольшие количества 5N NaOH (напр., 5 мкл), при этом проверяя pH либо потенциометром, либо лакмусовой бумажкой.
3. Развести образцы со скорректированным pH 1:10 фосфатно-солевым буфером. pH разведенных образцов при этом должен быть между 7,0 и 8,0.

#### С. Стандартный протокол

1. Составить рабочий лист с показанными на нем позициями калибраторов и образцов

ВМК	Калибратор		Образец		Образец		Образец		Образец		Образец	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	QC1	QC1								
B	0,0625	0,0625	QC2	QC2								
C	0,125	0,125	U1	U1								
D	0,25	0,25	U2	U2								
E	1	1	U3	U3								
F	2	2										
G	4	4										
H	8	8										

2. Раскапать:
  - 50 мкл ВМК калибраторов в соответствующую лунку
  - 50 мкл разведенных контролей и образцов в соответствующую лунку
3. Добавить 50 мкл Анти-ВМК-Ферментного конъюгата в каждую лунку
4. Помешать плашку, поведив её по горизонтальной плоскости в течение минуты. Можно использовать шейкер. Дать плашке постоять при комнатной температуре 1 час.
5. Промыть ОДИН РАЗ стандартным солевым раствором. Удалите инкубационную смесь декантацией плашки в раковину и постукиванием её по абсорбирующей бумаге. Добавить 300 мкл нормального солевого раствора в каждую лунку. Удалите солевой раствор декантацией плашки в раковину и постукиванием её по абсорбирующей бумаге. Это также может быть сделано планшетным вошером.
6. Добавить 100 мкл Хромогенного раствора и дать постоять при комнатной температуре 25 минут.
7. Добавить 100 мкл Стоп-раствора в лунки.
8. Измерить оптическую плотность при 450 нм.

### Схематическое изображение процедуры

<b>МИКРОЛУНОЧНАЯ ПЛАШКА</b>	
	⇒ Калибратор ВМК, или контроль, или образец, 50 мкл ⇒ Раствор Конъюгированных ферментом анти-ВМК антител, 50 мкл (встряхивать 1 мин)
<b>РЕАКЦИЯ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО</b>	
	(При 20-30°C, комн. темп. в течение 1 часа)
<b>ПРОМЫВКА</b>	Один раз в нормальном солевом растворе, 300 мкл
	⇒ ВМК/ГВК Окрашивающий реагент, 100 мкл

## EIA-1620, VMA ELISA - ВМК (Ванилилминдальная кислота)

<b>ФЕРМЕНТНАЯ РЕАКЦИЯ</b>
(При 20-30°C, в течение 25 минут) ⇒ ВМК/ГВК Стоп-раствор, 100 мкл
<b>СЧИТЫВАНИЕ 450 нм</b>
<b>Подсчет концентраций по стандартной кривой</b>

### ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

- Используя линейно-логарифмическую бумагу (Рис. 2) или бумагу логит-лог (рис. 3) кривая Калибровки произведена, готовя концентрации ВМК на абсциссе и спектральную поглощательную способность на ординате. Концентрация ВМК для каждого неизвестного образца получена из кривой Калибровки.

Например:

Описание	Поглощение (450 нм)		Среднее по В/В <sub>0</sub> (%)	ВМК (мкг/мл)
Калибратор ВМК (мкг/мл)				
0	1.487	1.466	100.0	
0,0625	1.255	1.258	85.1	
0,125	1.037	1.052	70.7	
0,25	0.818	0.839	56.1	
1	0.359	0.378	25.0	
2	0.245	0.261	17.1	
4	0.145	0.145	9.8	
8	0.078	0.084	5.5	
Образец А	1.299	1.218	82.9	0.072 x 10
Образец В	0.769	0.746	51.3	0.285 x 10
Образец С	0.522	0.522	35.4	0.600 x 10

Результаты, полученные выше, указывают концентрацию ВМК в мкг/мл. Когда требуется полный ВМК в 24-часовом образце мочи

$$\text{ВМК(мкг/мл)} \times \frac{\text{объем мочи (мл)}}{1000} = \text{ВМК мг/сутки}$$

или, когда требуется значение ВМК/Креатинин

$$\text{ВМК(мкг/мл)} \div \frac{\text{Креатинин (мг/дл)}}{100} = \text{ВМК мкг/мл Креатинина} \quad \text{или} \quad \text{ВМК мг/г Креатинина}$$

- Чтобы нарисовать калибровочные кривые, основанные на 4-хкоэффициентном логит-лог, вычисление может быть сделано с помощью компьютера.

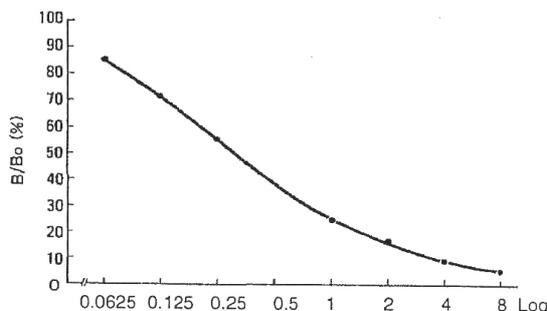
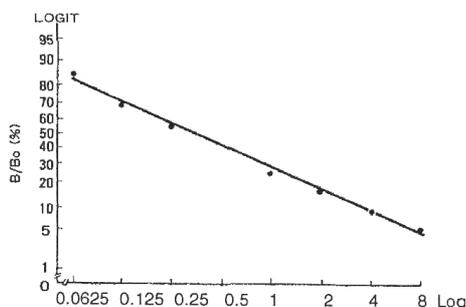


Рис. 2 Калибровочная кривая на линейно-логарифмической бумаге



**ВНИМАНИЕ:** Это – кривая для примера. Она не должна использоваться для вычисления результатов по неизвестным образцам.

### ПРОЦЕДУРНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ

- Очень важно вымыть микролунки полностью, однообразно и удалить любую остаточную жидкость из лунок, чтобы достигнуть оптимальных результатов.
- Пипетировать Калибраторы или образцы мочи на дно каждой лунки. Вортекс или встряхивание лунок после каждого пипетирования не требуются.

Рис. 3 Калибровочная кривая на бумаге логит-лог

### EIA-1620, VMA ELISA - ВМК (Ванилилминдальная кислота)

- Спектральная поглощательная способность - функция времени инкубации и температуры. Поэтому рекомендуется обеспечить одинаковые затраты по время для каждого пипетирования без прерывания.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ

- Этот ВМК ELISA комплект разработан только для количественного определения ВМК в моче.
- Все образцы с концентрациями ВМК, выше, чем 8 мкл/мл, должны быть повторно протестированы при значительно большем разведении, например, 1:20 или больше.
- Взаимодействие с Азидом Натрия: Поскольку Азид Натрия ингибирует реакцию фермента, моча или любой другой буфер, призванный разводить образцы мочи, содержащие азид натрия как антисептик, нельзя использовать.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Чтобы контролировать точность аналитической работы, рекомендуется, чтобы коммерчески доступные образцы контроля мочи были включены в каждую постановку.

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждая лаборатория должна определить нормальный интервал, который бы соответствовал особенностям проверяемого населения. Интервал, данный здесь, был определен от отборов суточной мочи у 280 пациентов. Мочевой креатинин был измерен на Astra, чтобы оценить полноту каждого отбора, а также было вычислено отношение мг ВМК на грамм креатинина.

	ВМК мг/сутки	ВМК мг/г Креатинина
Количество образцов (n)	280	280
Среднее (x)	7,92	6,87
Интервал $\pm 2$ CO	0,4 – 15,44	0,00 – 14,37
Референтный интервал	До 15,0	До 14,0
	Рис 4.	Рис.5

Где CO = Стандартное Отклонение

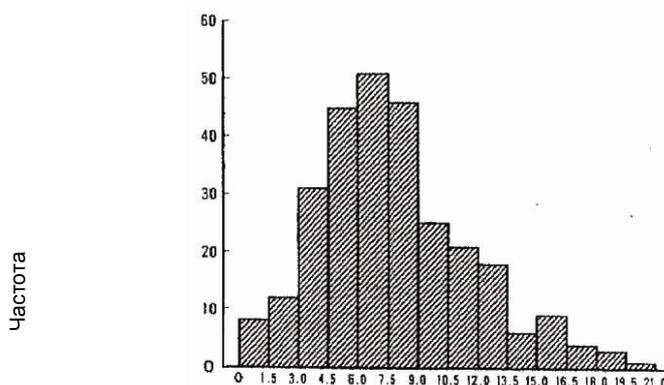


Рис. 4 Распределение общей экскреции ВМК за сутки у 280 случаев нормального контроля

## ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ

### ТОЧНОСТЬ

**а. Восстановление** – исследования на восстановление были выполнены в образцах мочи от четырех здоровых взрослых, к которым ВМК был добавлен при различных концентрациях. Восстановление было определено делением наблюдаемой величины на математическое ожидание для каждого готового образца.

Уровень

Вариации ВМК (мг/сутки)

Образец	Базовая линия (мкг/мл)	Добавлено (мкг/мл)	Ожидаемые значения (мкг/мл)	Наблюдаемые значения (мкг/мл)	Восстановление (%)
A	1,76	0,00	10,48	10,10	96
	0,88	9,60			
	1,32	4,80			
	1,54	2,40			
	1,65	1,20			
B	6,16	0,00	12,68	12,85	101
	3,08	9,60			
	4,62	4,80			
	5,39	2,40			
	5,77	1,20			
C	11,71	0,00	15,45	15,85	102
	5,85	9,60			
	8,78	4,80			
	10,24	2,40			
	10,98	1,20			
D	8,43	0,00	13,81	15,14	109
	4,21	9,60			
	6,32	4,80			
	7,37	2,40			
	7,90	1,20			

Вариации ВМК (мг/сутки Креатинина)

## EIA-1620, VMA ELISA - ВМК (Ванилилминдальная кислота)

**в. Линейность и Параллелизм** - Четыре образца мочи и два коммерческих контроля мочи Lyphochek 1, и 2 (Bio-Rad) были последовательно растворены фосфатно-солевым буфером. Было вычислено и отпечатано на бумаге лог-логит отношение (B/Bo) абсорбции для каждого разведения (B) к абсорбции 0 мкг/мл Калибраторов (Bo).

### ЧЕТКОСТЬ

**а.** Коэффициент внутри постановки изменения был оценен в трех образцах мочи при различных концентрациях ВМК.

Внутри постановки	Образец А	Образец В	Образец С
N	26	24	24
Среднее (мг/мл)	0,96	8,25	11,24
СО (мг/мл)	0,06	0,52	0,71
КВ (%)	6,0	6,3	6,0

**б.** Коэффициент между постановками изменения был оценен при трех различных концентрациях, анализируя образцы в 16 - 19 отдельных случаях.

Между постановками	ВМК 1	ВМК 2	ВМК 3
N	26	24	24
Среднее (мг/мл)	0,96	8,25	11,24
СО (мг/мл)	0,06	0,52	0,71
КВ (%)	6,0	6,3	6,0

Где СО = Стандартное отклонение, КВ = Коэффициент Вариации, N = количество измерений

### СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Следующие вещества были проверены на поперечную реактивность анализа. Перекрестная реактивность выражена в виде процента от концентрации каждого вещества, которое произвело 50%-ое смещение.

Вещество	Перекрестная реакция с ВМК (%)
Ванилилминдальная кислота	100
Гомованилиновая кислота	<0,01
DL-3,4-Дигидроксиминдальная кислота	4
3,4- Дигидроксиминдальная кислота	<0,01
Метанефрин	<0,01
Ванилпировиноградная кислота	4
Ванильная кислота	<0,01
Допамин	<0,01
5-Гидрокси-3-индолуксусная кислота	<0,01
Ванилилукусусная кислота	<0,01
3-Метокси-4-гидроксифенил гликоль	<0,01

### ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Чувствительность этого теста выше чем 0.0625 мкг/мл. Минимальная обнаруживаемая концентрация ВМК, как выяснилось, составляет 0.035 мкг/мл. Минимальная обнаруживаемая концентрация определена как концентрация ВМК, которой соответствует абсорбция плюс минус два стандартных отклонения от средней абсорбции 20 определений нулевой дозы ВМК

### СТАБИЛЬНОСТЬ ОБРАЗЦА

Стабильность образца была изучена в двух различных образцах мочи при 4°C и -20°C в течение 5 дней и 50 дней, соответственно. Результаты подтверждают, что ВМК устойчива при 4°C по крайней мере в течение 5 дней, и в течение 50 дней при -20°C.

### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).