



## ИФА-набор для количественного определения метанефрина в моче

Кат. № : EIA-4315  
 Количество тестов : 96  
 Производитель : DRG (США)

Методика от 12-2011  
 Версия 7.0

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

### 1. ВВЕДЕНИЕ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Во время подготовки образцов метанефрин (метадреналин) количественно ацилируется. В наборе применяется твердофазный конкурентный метод иммуноферментного анализа на планшетах. Антиген иммобилизован на поверхности лунок планшета (твердой фазе). Ацилированные калибраторы, контроли и исследуемые образцы, а также иммобилизованный на твердой фазе аналит конкурируют за ограниченное число центров связывания специфических антител. Когда система достигает равновесия, несвязавшийся антиген и несвязавшиеся комплексы антиген-антитело удаляют промывкой. Антитела, связавшиеся с метанефрином, иммобилизованным на твердой фазе, выявляют конъюгатом антикроличьих IgG с пероксидазой. В качестве субстрата используется ТМБ. Интенсивность реакции измеряют при длине волны 450 нм. Количество антител, связавшихся с метанефрином, иммобилизованным на твердой фазе, вычисляется по стандартной кривой, построенной по калибраторам с известной концентрацией.

### 2. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАБОРА

#### 2.1. Надежность результатов

Чтоб обеспечить надежную оценку результатов анализа, нужно проводить его согласно поставленным инструкциям и в соответствии с законодательством и надлежащей лабораторной практикой. Необходимо уделить особое внимание контрольным проверкам на предмет точности и правильности анализа; результаты данных контрольных проверок должны находиться в диапазоне нормы. В случае серьезных противоречий между установленными характеристиками анализа и реальными результатами, пожалуйста, свяжитесь с производителем для дальнейших инструкций.

Каждой лаборатории рекомендуется установить собственные эталонные интервалы. Значения, представленные в данной инструкции являются только примером.

Результаты исследования, проведенного данным набором, не должны служить единственной основой для какого-либо терапевтического заключения; их следует сравнивать с другими диагностическими тестами и клиническими наблюдениями.

#### 2.2 Жалобы

В случае жалоб просим представить в письменном виде отчет со всеми данными относительно проведения анализа, полученных результатов, а также копию распечатки оригинального анализа. Свяжитесь с производителем для получения бланка рекламации, заполните его и верните производителю.

#### 2.3. Гарантия

Данный анализ был произведен в соответствии с новейшими технологическими разработками и подлежит обязательной проверке внутреннего и внешнего контроля качества. Какое-либо изменение набора или процедуры проведения анализа, а также использование реагентов из других систем могут отрицательно повлиять на результаты и, соответственно, не подлежат гарантии. Производитель не несет ответственности за повреждения, возникшие при перевозке.

#### 2.4. Уничтожение

Остатки веществ, химикатов, реагентов и готовых к использованию растворов являются особыми отходами. Их удаление регулируется нормами законодательства каждого отдельного государства. Информацию об удалении особых отходов можно получить у органов, ответственных за удаление отходов. При удалении отходов руководствуйтесь государственным законодательством.

Соответственные паспорта безопасности продуктов можно получить по запросу. Паспорта безопасности отвечают стандарту ISO 11014-1.

#### 2.5. Интерференция

НЕ смешивайте реагенты и растворы из разных лотов. Учитывайте требования к условиям хранения и транспортировки. Неправильное обращение с образцами или отклонения от процедуры анализа может повлиять на результаты. Не используйте компоненты набора после истечения срока годности. Избегайте микробной контаминации реагентов и воды для промывания. Внимательно изучите периоды инкубации и требования к промыванию.

#### 2.6. Предостережения

Придерживайтесь периодов инкубации и требований к промыванию. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей. Не курите, не ешьте и не пейте в помещениях работы с реагентами. При работе с компонентами набора или образцами всегда надевайте защитные перчатки, а по окончании работы тщательно мойте руки. Избегайте разбрызгивания и какого-либо контакта реагентов с кожей. Надевайте защитную одежду.

Все этапы анализа должны проводиться согласно протоколу. Оптимальные результаты можно получить только при использовании пипеток. Азид натрия может взаимодействовать свинцом и медью пробирок с образованием взрывчатых соединений, для предотвращения этого необходимо промывать их большим объемом воды.

Все реагенты набора, содержащие человеческую или животную сыворотку или плазму, протестированы и имеют подтвержденный отрицательный результат по ВИЧ (I/II), HbsAg, HCV. Тем не менее, все реагенты должны рассматриваться как потенциально инфицированные и соответственно утилизироваться.

### 3. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при температуре 2 – 8°C в течение всего срока годности. Не используйте компоненты набора по истечении срока годности, указанного на этикетке. Не смешивайте компоненты наборов из разных лотов в одном анализе.

### 4. СОСТАВ НАБОРА

1. Стандарт А	1 x 4 мл	Готов к использованию
2. Стандарт В	1 x 4 мл	Готов к использованию

3.	Стандарт С	1 x 4 мл	Готов к использованию
4.	Стандарт D	1 x 4 мл	Готов к использованию
5.	Стандарт E	1 x 4 мл	Готов к использованию
6.	Стандарт F	1 x 4 мл	Готов к использованию
7.	Ацилирующий концентрат. Разбавить перед использованием	1 x 0,5 мл	Концентрат
8.	Соляная кислота, содержит 0,25 М HCl	1 x 30 мл	Готов к использованию
9.	Контроль 1	1 x 4 мл	Готов к использованию
10.	Контроль 2	1 x 4 мл	Готов к использованию
11.	Ацилирующий разбавитель	1 x 4 мл	Готов к использованию
12.	Реакционные пробирки	2 x 50 шт.	Готов к использованию
13.	Конъюгат фермента конъюгированные с пероксидазой антикроличьи IgG	1 x 12 мл	Готов к использованию
14.	Промывочный буфер, концентрат Развести содержимое дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл	1 x 20 мл	Концентрат
15.	Субстрат содержит раствор ТМБ	1 x 12 мл	Готов к использованию
16.	Стоп-раствор содержит 0,25 М H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 x 12 мл	Готов к использованию
17.	Ацилирующий буфер	1 x 30 мл	Готов к использованию
18.	Реакционный микропланшет 12 стрипов с иммобилизованным адреналином-метанефрином, разделяемые на отдельные лунки, покрытые метанефрином (синего цвета)	1 x 96 лунок	
19.	Антисыворотка к Метанефрину кроличья (синего цвета, с синей закручивающейся крышкой)	1 x 12 мл	Готов к использованию

#### 4. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Автоматические пипетки (10-100 мкл и 100-1000 мкл)
- Устройство для промывки планшетов
- Планшетный фотометр, способный измерять оптическую плотность при длине волны 450 и 620-650 нм
- Центрифуга на 3000 об/мин
- Впитывающий влагу материал (бумажные полотенца) для промокания стрипов
- Дистиллированная вода, вортекс
- Водяная баня на 90°C или похожее нагревающее устройство.

\*Анализ можно проводить с встряхиванием и без него. Если используется шейкер, он должен иметь следующие характеристики: амплитуда встряхивания 3 мм, прилб. 600 об/мин.

#### 5. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Можно использовать как разовую, так и суточную мочу. Весь объем суточной мочи следует поместить в одну емкость, содержащую 10 – 15 мл 6 М соляной кислоты. Определите общий объем мочи, выделенной на протяжении 24 часов, для расчета результатов. Образцы мочи можно хранить при температуре минус 20°C до 6 мес. Избегать повторного замораживания и оттаивания. Предохранять от воздействия прямых солнечных лучей.

#### 6. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед использованием все реагенты следует прогреть до комнатной температуры и тщательно перемешать. Пронумеруйте соответственно реакционные пробирки. Рекомендуется проводить анализ в дубликатах.

##### 6.1 Приготовление реагентов

###### Промывочный буфер

Растворить 20 мл концентрата промывочного буфера в дистиллированной воде до конечного объема 1000 мл. Хранение: до 6 месяцев при 4-8 °С.

###### Ацилирующий раствор

Перед приготовлением ацилирующего раствора убедитесь в том, что ацилирующий разбавитель достиг комнатной температуры ( $\geq 20^{\circ}\text{C}$ ) и является однородным раствором без кристаллов.

Разбавьте ацилирующий концентрат 1 + 60 ацилирующим разбавителем в стеклянной или полипропиленовой пробирке.

Ацилирующий концентрат	10 мкл	20 мкл	25 мкл	50 мкл
Ацилирующий разбавитель	600 мкл	1,2 мл	1,5 мл	3 мл

\*Ацилирующий раствор необходимо приготовить непосредственно перед проведением анализа (не раньше, чем за 60 минут). После использования выбросить!

##### 6.2 Подготовка образцов и ацилирование

###### Гидролиз

1. Внесите по 25 мкл стандартов, контролей и образцов в соответствующие реакционные пробирки.
2. Добавьте 250 мкл соляной кислоты во все пробирки.
3. Тщательно перемешайте содержимое (вортексом) и гидролизуйте 30 мин. при 90°C.
4. Дайте пробиркам остыть до комнатной температуры.

При определении только свободного метанефрина п.3-4 можно опустить.

###### Ацилирование:

5. Внесите во все пробирки по 250 мкл ацилирующего буфера.
6. Внесите во все пробирки по 25 мкл ацилирующего раствора.
7. Тщательно перемешайте (на вортексе) и ацилируйте 15 минут при комнатной температуре (20-25°C).
8. Добавьте во все пробирки по 2,5 мл дистиллированной воды.

Отберите по 25 мкл ацилированных стандартов, контролей и образцов мочи для исследования метанефрина в иммуноферментном анализе.

### 6.3. Иммуноферментный анализ метанефрина

Использование шейкера необязательно. Альтернативный протокол без шейкера выделено курсивом на сером фоне.

1. Внесите в соответствующие лунки стрипов по 25 мкл ацилированных стандартов, контролей и исследуемых образцов.
2. Внесите во все лунки по 100 мкл **антисыворотки к метанефрину**.
3. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (20–25°C) при встряхивании на орбитальном шейкере (600 об/мин).  
**Без использования шейкера: резко встряхните стрипы руками и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (20–25°C).**
4. Удалите или аспирируйте содержимое лунок и тщательно их промойте, добавляя по 300 мкл разведенного промывочного буфера в каждую лунку. Повторите промывание 3 раза. Удалите остатки жидкости из лунок, слегка постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.
5. Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата фермента.
6. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (20–25°C) при встряхивании на орбитальном шейкере (600 об/мин).  
**Без использования шейкера: инкубируйте 15 минут при комнатной температуре (20–25°C).**
7. Удалите содержимое лунок и тщательно промойте каждую 3 раза, добавляя по 300 мкл разведенного промывочного буфера в каждую лунку. Удалите остатки жидкости из лунок, слегка постукивая перевернутым планшетом о фильтровальную бумагу.
8. Внесите во все лунки по 100 мкл субстрата.
9. Инкубируйте в течение 15 ± 2 минут при комнатной температуре при встряхивании на орбитальном шейкере (600 об/мин).  
**Без использования шейкера: инкубируйте 15 ± 2 минут при комнатной температуре (20–25°C).**  
*Избегайте воздействия прямых солнечных лучей!*
10. Добавьте во все лунки по 100 мкл стоп-реагента и встряхните планшет для перемешивания субстрата и стоп-реагента.
11. Измерьте оптическую плотность раствора не позже, чем через 10 минут с помощью планшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм и референтной длине волны между 620 нм и 650 нм.

### 7. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стандарт	Концентрации стандартов					
	A	B	C	D	E	F
Метанефрин (нг/мл)	0	20	60	200	600	2000
Метанефрин (нмоль/л)	0	101	304	1014	3042	10140
Перевод единиц	Метанефрин (нг/мл) × 5,07 = метанефрин (нмоль/л)					

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого стандарта, контроля или исследуемого образца. На миллиметровой бумаге постройте калибровочную кривую зависимости средней оптической плотности стандартов (по линейной оси Y) от log концентрации метанефрина в стандартах в нг/мл (по логарифмической оси X). Используйте нелинейную регрессию для построения калибровочной кривой (сплайн, 4 параметра, Акима).

Концентрации контролей и образцов можно прочесть прямо из калибровочной кривой.

Количество аналита, выделенного за день, рассчитывается следующим образом:

Концентрация образца (в мкг/л) × объем мочи, выделенной за день (в л/день)

Например:

Концентрация образца, считанная с кривой равна 125 мкг/л. Объем мочи, выделенной на протяжении 24 часов равен 1,3 л. Таким образом, количество аналита, выделенного за день, равно:

125 мкг/л × 1,3 л/день = 162,5 мкг/день

#### 7.1. Контроль качества

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормативами. Используйте контроли как с нормальными, так и с патологическими уровнями.

Концентрации метанефрина в контролях DRG и других коммерческих контролях не должны выходить за рамки заданных диапазонов. Заданные диапазоны контролей DRG указаны в листе контроля качества (QC Report).

#### 7.2. Калибровка

Связывание антисывороток и конъюгата фермента, а также активность использованного фермента термозависимы, поэтому значения оптических плотностей могут изменяться, если не используется термостат. Чем выше температура, тем будут выше значения оптических плотностей. Сходные колебания связаны и с изменением времени инкубации. Оптимальная температура при иммуноферментном анализе – 20–25°C.

**Примечание:** при превышении максимальных значений оптической плотности, измеряемых прибором при длине волны 450 нм, можно измерить оптическую плотность в лунках не более чем через 10 минут, используя длину волны 405 нм.

#### 7.3. Калибровка

На стр. 4 английского варианта инструкции по применению приводится образец типичной калибровочной кривой набора Метанефрин мочи ИФА. Пожалуйста, не используйте эту кривую для определения концентрации метанефрина в образцах.

Пример типической калибровочной кривой см. в оригинале инструкции на стр. 6. Не использовать пример для расчетов!

### 8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### Ожидаемые значения

Референтные значения, приведенные ниже, могут служить только в качестве ориентировочных. Рекомендуется каждой лаборатории выработать собственные значения нормы.

Моча	Метанефрин < 350 мкг/день
------	------------------------------

#### Чувствительность

	Метанефрин
--	------------

Аналитическая чувствительность (предел определения)	13 нг/мл
---	----------

Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)

## Метанефрин

Соединение	Перекрестная реакция (%)
Метанефрин	100
Норметанефрин	0,15
3-Метокситирамин	<0,01
Адреналин	3,3
Норадреналин	<0,001
Допамин	<0,001
Ванилин-миндальная кислота	<0,001
Гомованилиновая кислота	<0,001
L-Допа	<0,001
L-Тирозин	<0,001
Тирамин	<0,001

## Точность

Вариабельность в пределах постановки		
Образец	Диапазон (нг/мл)	КВ (%)
1	69 ± 8,6	12,6
2	446 ± 23	5,2

Вариабельность между постановками		
Образец	Диапазон (нг/мл)	КВ (%)
1	102 ± 15,4	7,7
2	448 ± 40	8,9

## Линейность

		Диапазон	Серийное разбавление до	Среднее (%)
Метанефрин	Моча	40 – 1600 нг/мл	1:16	98

## Восстановление

		Среднее (%)	Диапазон (%)	% восстановления после насыщения
Метанефрин	Моча	105	98 - 119	

## Сравнение с другим методом анализа

Сравнение метода против ВЭЖХ*	Метанефрин	Моча	ВЭЖХ = 0,9 RIA – 0,8	г = 0,99, n = 40

\*Концентрации определяли набором DRG ИФА (ось X) и методом ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) (образцы для внешнего контроля качества присланы из UK NEQAS). Получены прекрасные результаты по корреляции между методом ИФА и ВЭЖХ. Просим учесть, что значения концентраций контролей из UK NEQAS являются средней величиной, полученной при статистической обработке результатов ВЭЖХ примерно 40 различных пользователей, и в группе всегда есть один патологический образец.

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)