

Noradrenalin ELISA (EIA-4317)

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест Норадреналин ИФА – диагностическая *in vitro* иммуноферментная (ИФА) тест-система для количественного определения норадреналина в плазме крови и моче.

1. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.
2. Не используйте компоненты набора по истечении срока годности.
3. Не путайте реагенты набора разных назначений!
4. Избегайте микробной контаминации реагентов и промывочных растворов.
5. Соблюдайте указанные в инструкции режимы инкубации и промывки.
6. Не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей.
7. Не курите, не ешьте и не пейте в зоне работы с образцами или тестовыми пробирками к набору.
8. При работе с компонентами набора или с образцами всегда надевайте предохраняющие перчатки, тщательно мойте руки сразу после окончания работы.
9. Избегайте разбрызгивания реагентов и образцов!
10. Необходимо точно соблюдать объемы всех реагентов и образцов, указанных в различных разделах инструкции (объемы при отборе пипеткой или в процессе подготовки). Правильные результаты анализа можно получить лишь при использовании аттестованных пипеток.

2. ВВЕДЕНИЕ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Катехоламины – это название группы ароматических аминов (в которую входят норадреналин, адреналин, дофамин и их производные), функционирующих, соответственно, как гормоны и нейротрансмиттеры.

Их действие направлено на сердечную мускулатуру и метаболизм (адреналин), а также на периферическую циркуляцию (норадреналин), и помогает организму справляться с острым и хроническим стрессом. Увеличенную продукцию катехоламинов можно наблюдать в различных опухолях хромаффинной системы (таких как феохромоцитома, нейробластома, ганглионейрома). Повышенная или сниженная концентрация катехоламинов может быть найдена при гипертензии, дегенеративных кардиологических заболеваниях, шизофрении и маниакально-депрессивном психозе. Измерение дофамина и его производных имеет особое диагностическое значение для проверки детей, подозреваемых на наличие нейробластомы.

Набор содержит реагенты для количественного определения норадреналина в моче и плазме. Норадреналин экстрагируется из образцов с использованием аффинного геля, специфичного к цис-диолюльным группам, затем ацилируется до N-ацилнорадреналина и в ходе процедуры детекции подвергается энзиматическому превращению в N-ацилнорметанефрин.

Тест Норадреналин ИФА представляет собой твердофазный конкурентный метод иммуноферментного анализа на стрипах микропланшета. Норадреналин иммобилизован на поверхности лунок планшета (твердой фазе). Ацилированный норадреналин и норадреналин, иммобилизованный на твердой фазе, конкурируют за ограниченное число центров связывания специфичных к норадреналину антител кролика. Когда система достигает равновесия, несвязавшийся антиген и несвязавшиеся комплексы антиген-антитело удаляются промывкой. Антитела, связавшиеся с норадреналином, иммобилизованным на твердой фазе, выявляют с помощью пероксидазного конъюгата антител к IgG кролика, используемого в качестве субстрата ТМБ. Интенсивность реакции измеряют при длине волны 450 нм. Количество антител, связавшихся с норадреналином, иммобилизованным на твердой фазе, обратно пропорционально концентрации норадреналина в образце.

3. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

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

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Набор Норадреналин ИФА (номер по каталогу EIA-4317) содержит реагенты, достаточные для выполнения 96 определений в дублях (включая стандарты) норадреналина.

4.1. Реагенты, необходимые для экстракции и ацилирования образцов:

Стандарт А, Норадреналин (0 нг/мл), 1 x 1 мл, готов к использованию
Стандарт В, Норадреналин (4 нг/мл), 1 x 1 мл, готов к использованию
Стандарт С, Норадреналин (16 нг/мл), 1 x 1 мл, готов к использованию
Стандарт D, Норадреналин (64 нг/мл), 1 x 1 мл, готов к использованию
Стандарт E, Норадреналин (256 нг/мл), 1 x 1 мл, готов к использованию
Стандарт F, Норадреналин (1024 нг/мл), 1 x 1 мл, готов к использованию
Контроль, 1, 1 x 1 мл, готов к использованию
Контроль, 2, 1 x 1 мл, готов к использованию
Ацилирующий буфер, 1 x 20 мл, готов к использованию
Ацилирующий реагент, 2 x 1,5 мл, готов к использованию
Буфер для анализа, 2 x 4 мл, готов к использованию, содержит 1 М HCl
Буфер для экстракции, 2 x 4 мл, готов к использованию
Макропланшет, 2 x 48 лунок покрытых борированным аффинным гелем
Хлористоводородная кислота, 1 x 20 мл, готова к использованию (желтый цвет), содержит 0,025 М HCl

4.2. Реагенты для иммуноферментного анализа:

Фермент, 2 x 1 мл/флакон, лиофилизированный, содержит фермент катехол-О-метилтрансферазу
Кофермент, 1 x 0,75 мл, готов к использованию, S-аденозил-L-метионин
Буфер для фермента, 1 x 4 мл, готов к использованию
Антисыворотка (кролика) к норадреналину, 1 x 6 мл, готова к использованию, желтого цвета
12 стрипов 8-луночных с иммобилизованным норадреналином (разделяемых на отдельные лунки), покрытых дериватизированным норадреналином, желтого цвета
Промывочный буфер, 2 x 50 мл, концентрат, разведите содержимое дистиллированной водой до конечного объема 500 мл
Конъюгат фермента, 1 x 11 мл, готов к использованию, конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgG кролика, зеленого цвета
Субстрат, 1 x 11 мл, готов к использованию, содержит ТМБ
Стоп-реагент, 1 x 11 мл, готов к использованию, содержит 0,25 М серную кислоту
Фольга для заклеивания стрипов, 1 x 4 шт.

5. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА:

- Автоматические пипетки (10, 20, 25, 50, 100, 125, 150, 300, 500, 600 и 1000 мкл)
- Устройство для промывки микропланшетов
- Планшетный спектрофотометр, способный измерять оптическую плотность при длине волны 450 нм
- Орбитальный шейкер (со скоростью встряхивания 400 – 900 об/мин; или орбитальный шейкер с диапазоном встряхивания 5 мм)
- Впитывающий материал для промокания стрипов.
- Дистиллированная вода
- Вортекс

6. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Плазма

DRG® Норадреналин ИФА (EIA-4317)

Для анализа необходимо использовать образцы плазмы, полученные с применением ЭДТА в качестве антикоагулянта. Физический и психический стресс обычно вызывает значительное возрастание концентрации катехоламинов. Поэтому рекомендуется дать пациенту отдохнуть в течение 20 – 30 минут после введения катетера в вену и перед забором образца крови. Для анализа нельзя использовать гемолизированные и, особенно, липемические образцы, так как для них могут быть получены ложные низкие уровни норадреналина. Образцы плазмы следует хранить не более 6 часов при температуре 2 – 8 °С. При необходимости более длительного хранения (до 6 месяцев) образцы следует держать при температуре – 20 °С.

Моча

Можно использовать как разовую, так и суточную мочу.

Весь объем суточной мочи следует поместить в одну емкость, содержащую 10 – 15 мл 6 М хлористоводородной кислоты в качестве консерванта, и перемешать. Избегайте воздействия на нее прямых солнечных лучей. Зарегистрируйте общий объем образца и отберите аликвоту для анализа. Для пациентов с предполагаемым заболеванием почек следует также провести анализ для определения концентрации креатинина. Образцы мочи можно хранить при температуре - 20 °С в течение 6 месяцев.

7. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1. Руководство по оптимальному использованию набора Норадреналин

норадреналин		
	Анализ с дублями	Анализ без дублей
	Один 48-луночный планшет для проведения экстракции	Два 48-луночных планшета для проведения экстракции
	96-луночный планшет для проведения ИФА	96-луночный планшет для проведения ИФА
Стандарты А – F	6 лунок для экстракции и 12 лунок для ИФА	6 лунок для экстракции и 6 лунок для ИФА
Контроли 1 – 2	2 лунки для экстракции и 4 лунки для ИФА	2 лунки для экстракции и 2 лунки для ИФА
Оставшиеся лунки	40 лунок для экстракции и 80 лунок для ИФА	88 лунок для экстракции и 88 лунок для ИФА
Соответствуют	40 образцам пациентов	88 образцам пациентов

7.2. Приготовление промывочного буфера

Разведите 50 мл концентрата промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 500 мл. Храните разведенный буфер при температуре 2 – 8 °С.

7.3. Приготовление раствора фермента

Важно: Ферментный раствор необходимо готовить непосредственно перед использованием (не более чем за 10 – 15 минут). Растворить содержимое флакона с надписью «Фермент» (“Enzyme”) в 1 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. Добавить 0,3 мл кофермента (“Coenzyme”), а затем – 0,7 мл буфера для фермента (“Enzyme Buffer”). Общий объем ферментного раствора составляет 2,0 мл.

Примечание: фермент, разведенный водой, рекомендуется аликвотировать и хранить в замороженном виде при температуре минус 20°С. Допускается только однократное замораживание

7.4. Подготовка образцов, экстракция и ацилирование

Компоненты набора и образцы перед использованием необходимо выдержать при комнатной температуре. Экстрагируют по 10 мкл каждого стандарта, контролей 1 и 2 и образцов мочи. Экстрагируют по 300 мкл образцов плазмы.

1. Внесите по 10 мкл стандартов А – F, по 10 мкл, контролей 1 и 2 и образцов мочи в соответствующие лунки макропланшета. Добавьте по 250 мкл дистиллированной воды для того, чтобы скорректировать объем. Внесите в соответствующие лунки по 300 мкл образцов плазмы.
2. Внесите во все лунки по 50 мкл буфера для анализа.
3. Внесите во все лунки по 50 мкл буфера для экстракции.
4. Закройте планшет фольгой для заклеивания стрипов и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере (600 – 900 об/мин).
5. Снимите фольгу и удалите ее в отходы. Немедленно встряхните жидкость из лунок и ее остатки удалите, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
6. Внесите во все лунки по 1 мл промывочного буфера, приготовленного из концентрата, закройте планшет фольгой и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере (600 – 900 об/мин).
7. Снимите фольгу и удалите ее в отходы. Немедленно встряхните жидкость из лунок и ее остатки удалите, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
8. Повторите стадию 6, встряхните жидкость из лунок и ее остатки удалите, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
9. Внесите во все лунки по 150 мкл ацилирующего буфера.
10. Добавьте во все лунки по 25 мкл ацилирующего реагента.
11. Инкубируйте планшет без фольги в течение 15 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере (600 – 900 об/мин).
12. Немедленно встряхните жидкость из лунок и ее остатки удалите (см. п.5).
13. Внесите во все лунки по 1 мл промывочного буфера, приготовленного из концентрата.
14. Инкубируйте планшет, закрытый фольгой, в течение 10 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере (600 – 900 об/мин).
15. Немедленно встряхните жидкость из лунок и ее остатки удалите (см. п.5).
16. Внесите во все лунки по 150 мкл хлористоводородной кислоты (0,025 М) для элюции норадреналина.
17. Закройте планшет фольгой и инкубируйте 10 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере (600 – 900 об/мин). **Внимание: Не удаляйте супернатант из лунок после инкубации!**

Для проведения ИФА необходимо следующее количество элюата, содержащего норадреналин:

Норадреналин
20 мкл

7.5. Иммуноферментный анализ с помощью набора Норадреналин ИФА

1. Внесите во все лунки по 25 мкл свежеприготовленного раствора фермента.
2. Внесите в соответствующие лунки по 20 мкл проэкстрагированных стандартов, контролей и образцов пациентов.
3. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере (400-500 об/мин).
4. Внесите в каждую лунку по 50 мкл антисыворотки к норадреналину.
5. Инкубируйте в течение 2 часов при комнатной температуре на орбитальном шейкере (400 – 500 об/мин).
6. Удалите содержимое лунок и тщательно их промойте, добавляя по 300 мкл разведенного концентрата промывочного буфера в каждую лунку. Повторите промывание 2 раза. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
7. Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата фермента.
8. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере (400 – 500 об/мин).
9. Удалите содержимое лунок и тщательно промойте каждую 3 раза. После цикла промывки удалите остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
10. Внесите во все лунки по 100 мкл субстрата.
11. Инкубируйте в течение 20 - 30 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере (400 – 500 об/мин).
Избегайте воздействия прямых солнечных лучей!
12. Внесите во все лунки по 100 мкл стоп-реагента и встряхните планшет для обеспечения гомогенного распределения раствора.
13. 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.

DRG® Норадреналин ИФА (EIA-4317)

8. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Концентрации стандартов:

Норадреналин: A = 0 нг/мл / B = 4 нг/мл / C = 16 нг/мл / D = 64 нг/мл / E = 256 нг/мл / F = 1 024 нг/мл.

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого стандарта, контроля или исследуемого образца.

На миллиметровой бумаге постройте калибровочную кривую зависимости средней оптической плотности стандартов (по оси Y) от лог концентрации норадреналина в стандартах в нг/мл (по оси X).

По калибровочной кривой рассчитайте концентрации норадреналина в контролях и исследуемых образцах, сопоставляя значения их средней оптической плотности с соответствующими концентрациями аналита.

Расчет концентрации норадреналина в образцах мочи и в контролях:

Содержание норадреналина в образцах мочи и в контролях рассчитывается непосредственно по калибровочной кривой.

Расчет концентрации норадреналина в образцах плазмы:

Для расчета концентрации норадреналина в образцах плазмы следует величины, определенные по калибровочной кривой, разделить на 30.

8.1. Контроль качества

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

8.2. Количественное определение

Калибровочная кривая, по которой определяются концентрации норадреналина в исследуемых образцах, строится путем откладывания значений измеренных оптических плотностей 6 стандартов по оси Y (линейные значения), а значений соответствующих им концентраций – по оси X (логарифмические значения). Результаты для исследуемых образцов вычисляются, используя один из следующих способов построения кривой: сплайн, Акима или четырехпараметрическая логистика. Ниже приводится образец типичной калибровочной кривой (см. рис. на стр. 6 английского варианта инструкции к данному набору). Пожалуйста, не используйте эту кривую для определения концентрации норадреналина в образцах.

9. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1. Калибровка

Набор откалиброван в нанограммах на миллилитр (нг/мл).

Для каждой группы выполненных тестов концентрации контролей, содержащихся в наборе, должны укладываться в указанные для данной серии набора диапазоны. К набору прилагается протокол с указанием значений этих диапазонов. Если значения концентрации контролей выходят за рамки заданных диапазонов, значит, результаты анализа могут быть недостоверными, и тест необходимо повторить.

Связывание антисывороток и конъюгатов 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 с изменением времени инкубации. Оптимальная температура при иммуноферментном анализе – 18 – 22°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.

9.2. Ожидаемые значения

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

	Норадреналин
Моча	< 90 мкг/день (535 нмоль/день)
Плазма	< 600 пг/мл

9.3. Чувствительность

Чувствительность рассчитана на основании значения оптической плотности стандарта 0 минус удвоенное среднее квадратичное отклонение.

	Норадреналин
Чувствительность в моче	1,33 нг/мл
Чувствительность в плазме	44 нг/мл

9.4. Специфичность

Различные биологические амины, их производные и похожие по структуре соединения проверяли на возможное перекрестное взаимодействие с антисывороткой к N-ацилнорметанефрину (используемой в наборе Норадреналин ИФА). Растворы этих соединений готовили в 0,1 N HCl в следующих концентрациях: 0,1, 1, 10 и 1 000 мкг/мл и тестировали, используя протокол анализа для образцов мочи.

Величина ED-50 для норадреналина = 0,03 мкг/мл.

Соединение	Величина ED-50 (мкг/мл)	Перекрестная реакция (%)
Дериватизированный норадреналин	0,03	100
Норметанефрин	5,8	0,48
Дофамин	14,2	0,2
Адреналин	19,6	0,14
3-метокситирамин	> 1,000	<0,003
Метанефрин	> 1,000	<0,003
Фенилаланин	> 1,000	<0,003
Кофеиновая кислота	> 1,000	<0,003
Гомованилиновая кислота	> 1,000	<0,003
Тирозин	> 1,000	<0,003
3-метокси-4-гидроксиминдальная кислота	> 1,000	<0,003
Тирамин	> 1,000	<0,003
3-метокси-4-гидроксифенидгликоль	300	0,01
L-Дофа	> 1,000	<0,003

9.5. Воспроизводимость

Воспроизводимость ИФА оценивали по коэффициенту вариации (CV) в пределах одной постановки и между постановками, проводя повторные исследования двух образцов мочи с различной концентрацией норадреналина.

Вариабельность в пределах постановки, n = 40		
Образец	Среднее ± SD (нг/мл)	CV (%)
1	24,4 ± 3,9	16,1
2	92,7 ± 9,0	9,8

Вариабельность между постановками, n = 11		
Образец	Среднее ± SD (нг/мл)	CV (%)
1	39,8 ± 3,4	8,5
2	135 ± 20,0	15,0

DRG® Норадреналин ИФА (EIA-4317)

9.6. Открытие

К образцу мочи и образцу плазмы добавляли возрастающие количества норадреналина. Исследовали каждый образец с дополнительно внесенным норадреналином. Аналитическое открытие норадреналина оценивали в образцах с 9 различными концентрациями, используя теоретически ожидаемые и практически полученные значения. Среднее значение открытия во всех образцах мочи с различными концентрациями составило 109% (SD 11%, диапазон 83 – 115%), во всех образцах плазмы – 97% (SD 8%, диапазон 85 – 108%).

9.7. Линейность

Линейность набора Норадреналин ИФА определяли, используя 7 различных разведений образца мочи и образца плазмы. Среднее значение линейности для норадреналина во всех разведениях образца мочи составило 100% (SD 14%, диапазон 85 – 123%), во всех разведениях образца плазмы – 100% (SD 14%, диапазон 84 – 123%). Соотношение между концентрацией и разведением мочи и плазмы достоверно не отличалось от заданной линейности при различных исследованных диапазонах концентраций (20 – 339 нг/мл и 636 – 2436 пг/мл).

9.8. Сравнение с другим методом анализа

Концентрацию норадреналина в 30 образцах мочи определяли набором DRG ИФА (ось X) и методом жидкостной хроматографии под высоким давлением (ось Y) (образцы для внешнего контроля качества QC, полученные от UK NEQAS). Корреляция между этими двумя методами была очень высокой. Это означает, что метод ИФА позволяет делать измерения по качеству не хуже, чем в случае ВЭЖХ. Следует принять во внимание, что величины данных контрольных образцов представляют собой средние значения, полученные примерно 40 различными пользователями ВЖХ и всегда содержат один патологический образец на постановку. По результатам линейно-регрессионного анализа установлена следующая корреляция: $y = 1,27x - 0,04$, $r = 0,96$. Два метода анализа сравнимы (см. рис. на стр. 7 английского варианта инструкции к данному набору).

10. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Адреналин (эпинефрин) и норадреналин (норэпинефрин) вместе с дофамином составляют группу катехоламинов, играющих в организме важную роль в качестве гормонов и нейротрансмиттеров. Катехоламины являются биологическими аминами, синтезирующимися из аминокислоты тирозина через промежуточный продукт L-дофа.

После осуществления своих эффектов адреналин и норадреналин подвергаются распаду через промежуточные продукты метанефрин и норметанефрин до конечного продукта метаболизма ванилилминдальной кислоты и экскретируются с мочой. Поэтому моча, так же как и плазма, используется в качестве материала биологических образцов для определения концентрации катехоламинов.

Синтез катехоламинов осуществляется преимущественно в мозговом веществе надпочечников и в нервных окончаниях симпатической нервной системы. Здесь они хранятся в гранулах, высвобождаются в ответ на воздействие специфических стимулов и осуществляют свои эффекты путем связывания со специфическими рецепторами клеточных мембран в органах-мишенях. Затем катехоламины быстро разрушаются под воздействием различных ферментов. Главная роль катехоламинов заключается в том, чтобы помочь организму адаптироваться к острым и хроническим стрессам. Адреналин влияет в основном на сердечную мускулатуру и метаболизм, тогда как норадреналин действует как вазоконстриктор на периферические артерии. Особым направлением, использующим определение концентрации катехоламинов в организме, являются исследования стресса и спортивная медицина.

Заболевания, связанные с измененными уровнями катехоламинов, включают гипертонию, дегенеративные заболевания сердца, шизофрению, маниакально-депрессивные состояния и опухоли с продукцией катехоламинов (нейробластома, ганглионейрома и феохромоцитомы). Из них наибольшее значение имеет феохромоцитомы. Феохромоцитомы – это опухоли, секретирующие катехоламины в чрезмерном количестве и происходящие из мозгового слоя надпочечников; при наличии феохромоцитомы хирургические операции с применением анестезии могут приводить к ситуациям, опасным для жизни. Около 10 % всех феохромоцитом дают злокачественный рост. Однако, в большинстве случаев их можно излечить путем оперативного вмешательства в сочетании с медикаментозной терапией с использованием α -адренергических антагонистов. Неопознанная феохромоцитомы представляет серьезный риск для пациента. Поэтому определение концентраций адреналина и норадреналина необходимо для пациентов с предполагаемой феохромоцитомой. Данные тесты также часто используются для первоначального установления диагноза гипертонии.

11. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

11.1. Надежность результатов анализа

Для того чтобы обеспечить надежные результаты анализа, его следует проводить в соответствии с прилагающимися инструкциями, а также с текущими правилами и нормативами (GLP (good laboratory practice), RILIBÄK и т.д.). Особое внимание следует обращать на контрольные исследования точности и правильности во время проведения анализа; результаты этих контрольных исследований не должны выходить за рамки нормальных диапазонов. В случае значительных расхождений в характеристиках анализа, указанных производителем и реально полученных Вами, пожалуйста, свяжитесь с производителем набора для получения дальнейших инструкций.

11.2. Действия терапевта

Результаты анализа всегда должны интерпретироваться в совокупности с другими клиническими данными и результатами других лабораторных исследований для того, чтобы помочь терапевту определить, какой из методов лечения будет наиболее продуктивным для данного пациента. Окончательный диагноз должен ставиться только на основании результатов всех лабораторных анализов и клинических данных.

11.3. Рекламации

В случае рекламации, пожалуйста, прилагайте письменный отчет, содержащий все данные по проведению анализа, полученным результатам, а также копии оригиналов распечаток. Пожалуйста, свяжитесь с региональным представителем DRG International, Inc. для получения формы рекламации и верните эту форму полностью заполненной производителю.

11.4. Гарантии

Набор произведен в соответствии с последними достижениями в технологии и подвергается обязательным внутренним и внешним проверкам контроля качества. Любые изменения в наборе или в процессе постановки анализа, а также использование реагентов непредусмотренного назначения могут отрицательно сказаться на результатах анализа и, таким образом, не подпадают под действие гарантии. Производитель не отвечает за повреждения, произошедшие при транспортировке.

12. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы приведен в оригинале инструкции на английском языке.

DRG® Норадреналин ИФА (EIA-4317)

96					Норадреналин ИФА КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ АНАЛИЗА Номер по каталогу: EIA-4317	 DRG Instruments, GmbH
----	-----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------

1. Приготовление раствора фермента

Это важно: Всегда следует готовить свежий раствор фермента перед проведением анализа (не дольше чем за 10 - 15 минут). Внесите во флакон с ферментом 1 мл дистиллированной воды и тщательно перемешайте. Затем добавьте 0,3 мл кофермента и затем - 0,7 мл буфера для фермента. Суммарный объем раствора фермента равен 2,0 мл.

2. Приготовление промывочного буфера

Разведите 50 мл концентрата промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 500 мл. Храните разведенный буфер при температуре 2 – 8 °С.

3. Взятие и хранение образцов

Плазма: ЭДТА-плазма; хранение: не более 6 часов при 2 – 8 °С, для более длительных периодов – хранение при – 20 °С.

Моча: Можно использовать как разовую, так и суточную мочу.
Суточную мочу поместить в емкость, содержащую 10 – 15 мл 6 М HCl. Более длительное хранение (до 6 месяцев) - при минус 20°С. Избегать воздействия прямых солнечных лучей.

4. Схема внесения образцов для экстракции и ацилирования

	Стандарты	Контроли	Моча	Плазма
Стандарты	10мкл			
Контроли		10мкл		
Моча			10мкл	
Плазма				300 мкл
Дистиллированная вода	250 мкл	250 мкл	250 мкл	
Буфер для анализа	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Буфер для экстракции	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл

Закройте планшет фольгой для заклеивания стрипов и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере (600 – 900 об/мин). Снимите фольгу и удалите ее в отходы. Немедленно вытряхните жидкость из лунок и ее остатки удалите, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.



Внесите во все лунки по 1 мл промывочного буфера, приготовленного из концентрата, закройте фольгой и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре на шейкере при 600 – 900 об/мин. Снимите фольгу и удалите ее в отходы. Немедленно вытряхните жидкость из лунок и ее остатки удалите.



Ацилирующий буфер	150 мкл	150 мкл	150 мкл	150 мкл
Ацилирующий реагент	25 мкл	25 мкл	25 мкл	25 мкл



Инкубируйте планшет без фольги, 15 минут при комнатной температуре при встряхивании на шейкере при 600 – 900 об/мин. Немедленно вытряхните жидкость из лунок и ее остатки удалите.



Разведенный концентрат промывочного буфера	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл
--------------------------------------------	------	------	------	------



Инкубируйте, закрыв планшет фольгой, 10 минут при комнатной температуре на шейкере при 600 – 900 об/мин. Немедленно вытряхните жидкость из лунок и ее остатки удалите.



Хлороводородная кислота	150 мкл	150 мкл	150 мкл	150 мкл
-------------------------	---------	---------	---------	---------



Инкубируйте, закрыв планшет фольгой, 10 минут при комнатной температуре на шейкере при 600 – 900 об/мин. Для проведения ИФА необходимы следующие объемы элюата:



Норадреналин				
20 мкл				

5. Схема постановки ИФА

	Стандарты	Контроли	Моча	Плазма
--	-----------	----------	------	--------

DRG® Норадреналин ИФА (EIA-4317)

Норадреналин:				
Раствор фермента	25 мкл	25 мкл	25 мкл	25 мкл
Стандарты/Контроли/Образцы	20 мкл	20 мкл	20 мкл	20 мкл

↓

Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре на шейкере при 400 – 500 об/мин.

↓

Антисыворотка к норадреналину	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
-------------------------------	--------	--------	--------	--------

↓

Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре на шейкере при 400 – 500 об/мин. Промойте 3 раза, добавляя по 300 мкл разведенного концентрата промывочного буфера в лунку. Удалите остатки жидкости, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.

↓

Конъюгат фермента	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------------	---------	---------	---------	---------

Инкубируйте 30 мин при комнатной температуре на шейкере при 400 – 500 об/мин. Промойте 3 раза, добавляя по 300 мкл разведенного концентрата промывочного буфера в лунку. Удалите остатки жидкости, постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.

Субстрат	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------	---------	---------	---------	---------

↓

Инкубируйте 20- 30 минут при комнатной температуре на шейкере при 400 – 500 об/мин.

↓

Стоп-реагент	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
--------------	---------	---------	---------	---------

↓

Измерьте оптическую плотность при 450 нм (референсная длина волны 620 – 650 нм).

6. Расчет результатов

Концентрации стандартов:

Норадреналин: A = 0 нг/мл / B = 4 нг/мл / C = 16 нг/мл / D = 64 нг/мл / E = 256 нг/мл / F = 1024 нг/мл.

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого стандарта, контроля или исследуемого образца.

На миллиметровой бумаге постройте калибровочную кривую зависимости средней оптической плотности стандартов (по оси Y) от *log* концентрации норадреналина в стандартах в нг/мл (по оси X).

По калибровочной кривой рассчитайте концентрации норадреналина в контролях и исследуемых образцах, сопоставляя значения их средней оптической плотности с соответствующими концентрациями аналита.

Расчет концентрации норадреналина в образцах мочи и в контролях:

Содержание норадреналина в образцах мочи и в контролях рассчитывается непосредственно по калибровочной кривой.

Расчет концентрации норадреналина в образцах плазмы:

Для расчета концентрации норадреналина в образцах плазмы следует величины, определенные по калибровочной кривой, **разделить на 30.**

7. Ожидаемые значения

Референтные значения, приведенные ниже, могут служить только в качестве ориентировочных.

	Норадреналин
Моча	< 90 мкг/день (535 нмоль/день)
Плазма	< 600 пг/мл

Рекомендуется каждой лаборатории выработать собственные значения нормы.

8. Чувствительность

Чувствительность рассчитана на основании значения оптической плотности стандарта 0 минус удвоенное среднее квадратичное отклонение.

	Норадреналин
Чувствительность в моче	1,33 нг/мл
Чувствительность в плазме	44 пг/мл