

# НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО МЕТАНЕФРИНА И СВОБОДНОГО НОРМЕТАНЕФРИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

## EIA-4082, MetCombi Plasma ELISA

Каталог. № : EIA-4082  
Количество : 96  
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 10-2013  
Версия 13.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ И ПРИНЦИП МЕТОДА

Перед проведением ИФА метанефрин (метадреналин) и норметанефрин (норметадреналин) количественно ацилируются в соответствующие N-ацил-производные.

Тест представляет собой твердофазный конкурентный метод иммуноферментного анализа на микропланшетах. Антигены иммобилизованы на поверхности лунок микропланшета (твердой фазе). Ацилированные метанефрин и норметанефрин, содержащиеся в образце, и иммобилизованные на твердой фазе нефрины конкурируют за ограниченное число центров связывания специфичных антител. Когда система достигнет равновесия, несвязавшийся антиген и несвязавшиеся комплексы антиген-антитело удаляются промывкой. Антитела, связавшиеся с нефринами, иммобилизованными на твердой фазе, выявляют конъюгатом антикриотичных IgG с пероксидазой. В качестве субстрата используется ТМБ. Интенсивность реакции измеряют при длине волны 450 нм. Количество связавшихся антител обратно пропорционально концентрации метанефрина и норметанефрина в образце и вычисляется по стандартной кривой, построенной по калибраторам с известной концентрацией.

### 2. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ТЕСТА

#### 2.1 Надежность результатов испытаний

В целях обеспечения надежной оценки результатов испытаний, его следует проводить в соответствии с инструкциями, а также в соответствии с текущими правилами и нормативами (GLP, RILIBÄK и т.д.). Особое внимание следует обращать на контрольные проверки точности и правильности во время испытания; результаты этих контрольных исследований не должны выходить за рамки нормального диапазона. В случае значительных расхождений между заданными характеристиками этого теста, и фактическими результатами, пожалуйста, свяжитесь с производителем набора для получения дальнейших инструкций.

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственные интервалы нормальных значений. Величины, приведенные в этом тесте инструкции, носят лишь ориентировочный характер.

#### 2.2 Жалобы

В случае жалобы, пожалуйста, предоставьте производителю письменный отчет, содержащий сведения о том, как тест проводился, полученные результаты, и копию оригинальной распечатки результатов. Пожалуйста, свяжитесь с производителем для получения формы рекламации, и верните ее, полностью заполненной, производителю.

#### 2.3 Гарантия

Данный набор был произведен в соответствии с последними достижениями в технологии и подвергается обязательным внутренним и внешним проверкам контроля качества. Любые изменения в наборе или в процедуре теста, а также использование реагентов непредусмотренного назначения могут оказать негативное влияние на результаты испытаний и, следовательно, не покрываются гарантией.

Производитель не несет ответственности за ущерб, причиненный при перевозке.

#### 2.4 Уничтожение отходов

Остатки материалов и/или все остатки реагентов и готовых к использованию растворов, являются специальными отходами. Уничтожение зависит от законов и нормативных актов страны. Утилизация набора должно проводиться в соответствии с нормативами страны. Правовой базой утилизации специальных отходов является пакет социально-экономических законов об отходах.

Данные по безопасности отдельных продуктов предоставляются по запросу. Данные по безопасности соответствуют стандарту ISO 11014-1.

#### 2.5 Интерференция

Не смешивать реагенты и растворы из разных лотов. Принимать во внимание условия транспортировки и хранения. Ненадлежащее обращение с образцами и отклонение от инструкции может повлиять на результаты. Не использовать компоненты набора после истечения срока годности. Избегать микробного загрязнения реагентов и воды для промывки. Соблюдать периоды инкубации и промывки.

#### 2.6 Меры предосторожности

Соблюдайте режимы инкубации и рекомендации по уходу. Никогда не пипетировать ртом и избегать контакта реагентов и образцов с кожей. Не курить, есть или пить на территории, где используются образцы или тестовые пробирки. При работе с компонентами набора или с образцами всегда надевайте защитные перчатки и тщательно мойте руки после окончания работы. Избегайте распыления любого рода. Избегайте контакта кожи с реагентами. Используйте защитную одежду и одноразовые перчатки.

Все шаги должны быть выполнены в соответствии с протоколом. Оптимальные результаты теста можно получить только при использовании калиброванных пипеток. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью труб и может образовывать взрывоопасный азид металла. При очистке, тщательно промойте их большим количеством воды, чтобы предотвратить такое образование.

Все реагенты данного тест-набора, содержащие человеческую или животную сыворотку или плазму, были испытаны и подтверждены как отрицательные для ВИЧ I / II, HBsAg и HCV по FDA утвержденным процедурам.

Все реагенты, однако, следует рассматривать как потенциально инфицированные при использовании и утилизации.

### 3. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Хранить реагенты - кроме концентрата для Ацилирования - при 2 - 8 ° С до истечения срока годности. Концентрат для Ацилирования следует хранить при комнатной температуре.

Не используйте компоненты набора по истечении срока годности, указанного на этикетке.

Не смешивайте компоненты из различных партий наборов в одном исследовании.

#### 4. СОСТАВ НАБОРА

|  |            |  |
|--|------------|--|
| Реакционные пробирки   | 2 x 50 шт. | Готовы к использованию   |
| Пленка для заклеивания стрипов   | 2 x 4 шт.  | Готова к использованию   |
| Промывочный буфер, концентрат  | 2 x 20 мл  | Концентрат. Разведите содержимое дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл  |
| Конъюгат фермента конъюгированные с пероксидазой антитела к IgG кролика                  | 2 x 12 мл  | Готов к использованию  |
| Субстрат содержит раствор тетраметилбензидаина (ТМБ)                                     | 2 x 12 мл  | Готов к использованию  |
| Стоп-реагент содержит 0,25М раствор серной кислоты                                       | 2 x 12 мл  | Готов к использованию  |
| Реакционный микропланшет   | 1 x 96     | 12 стрипов с иммобилизованным адреналином-метанефрином (разделяемых на отдельные лунки), покрытых производным метанефрина (голубого цвета)         |
| Реакционный микропланшет   | 1 x 96     | 12 стрипов с иммобилизованным норадреналином-норметанефрином (разделяемых на отдельные лунки), покрытых производным норметанефрина (желтого цвета) |
| Антисыворотка к норметанефрину кроличья, желтого цвета, с желтой закручивающейся крышкой | 1 x 6 мл   | Готова к использованию   |
| Антисыворотка к метанефрину кроличья, голубого цвета, с голубой закручивающейся крышкой  | 1 x 6 мл   | Готова к использованию   |
| Рабочий буфер  | 1 x 12 мл  | Готов к использованию  |
| Стабилизирующий реагент  | 2 x 10 мл  | Лиофилизированный  |
| Стандарт А   | 1 x 1 мл   | Готов к использованию  |
| Стандарт В   | 1 x 1 мл   | Готов к использованию  |
| Стандарт С   | 1 x 1 мл   | Готов к использованию  |
| Стандарт D   | 1 x 1 мл   | Готов к использованию  |
| Стандарт E   | 1 x 1 мл   | Готов к использованию  |
| Стандарт F   | 1 x 1 мл   | Готов к использованию  |
| Ацилирующий концентрат   | 1 x 1.5 мл | Концентрированный  |
| Контроль 1   | 1 x 4 мл   | Готов к использованию  |
| Контроль 2   | 1 x 4 мл   | Готов к использованию  |

#### 4.1 Требуемые дополнительные материалы и оборудование, 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
- Центрифуга на 3000 об/мин
- Шейкер (со скоростью встряхивания 600 об/мин; или с орбитой встряхивания 3 мм)
- Впитывающий влагу материал (бумажные полотенца или фильтровальная бумага) для промокания стрипов
- Дистиллированная вода
- Вортекс

#### 5. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

ЭДТА или цитрат-плазма должна быть использована.

Гемолизированные и особенно липемические образцы не должны быть использованы для анализа.

Хранение: до 6 часов при температуре 2 - 8 ° С, на более длительный срок (до 6 месяцев) при - 20 ° С.

Повторного замораживания и оттаивания следует избегать.

#### 6. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед использованием все реагенты следует прогреть до комнатной температуры и аккуратно перемешать. Отсчитать необходимое число реакционных пробирок. Рекомендуется проводить анализ в дубликатах.

*Процедуры осаждения и ацилирования являются одинаковыми для обоих анализов и должны быть проведены только один раз.*

*Если образцы должны быть разбавлены, Стабилизирующий реагент должен быть использован.*

#### 6.1 Приготовление реагентов

##### Промывочный буфер

Растворить 20 мл концентрата промывочного буфера в дистиллированной воде до конечного объема 1000 мл. Хранить при 2-8 °С до 6 месяцев.

##### Стабилизирующий реагент

Восстановить Стабилизирующий реагент с 10 мл дистиллированной воды.

Восстановленный Стабилизирующий реагент, который не используется немедленно, должен храниться в аликвотах при -20 °С и может быть разморожен только один раз.

##### Ацилирующий раствор

Ацилирующий концентрат следует хранить при комнатной температуре.

Добавьте 80 мкл Концентрата ацилирующего реагента к 3 мл дистиллированной воды и тщательно перемешайте.

Использовать сразу же!

*Ацилирующий реагент стабилен только в течение 3 минут.*

#### 6.2 Осаждение

1. Пипетировать **100 мкл стандартов, 100 мкл контролей и 500 мкл образцов плазмы** в соответствующие **реакционные пробирки**.
2. Добавить **500 мкл Стабилизирующего реагента** во все пробирки со стандартами и контролями.
3. Добавить **100 мкл Стандарта А** во все пробирки, содержащие образцы плазмы.
4. Тщательно перемешать **содержимое Реакционных пробирок** (вортекс) и центрифугировать в течение **15 минут при 3000 x g**. Взять **75 мкл** чистого супернатанта для ИФА Метанефрина и **25 мкл** чистого супернатанта для ИФА Норметанефрина.

### 6.3 Иммуноферментный анализ Метанефрина

1. Внести **50 мкл Рабочего Буфера** в соответствующие лунки Планшета Метанефрина.
2. Внести **75 мкл чистого супернатанта от стандартов, контролей и образцов** в лунки.
3. Внести по **25 мкл Ацилирующего раствора** (см. пункт 6.1) во все лунки.  
**Ацилирующий реагент стабилен максимум 3 минуты.**
4. Инкубировать в течение **15 мин при КТ (20-25 °С)** на орбитальном шейкере (около 600 оборотов в минуту).
5. Внести **50 мкл Антисыворотки Метанефрина** во все лунки.
6. Закрывать планшет **Пленкой**, встряхнуть в течение **1 минуты при КТ (20-25 °С)** на орбитальном шейкере и выдержать в течение **15 - 20 часов** (на ночь) при температуре **2-8 °С**.
7. Снять фольгу и выбросить. Удалить или аспирировать содержимое лунок и промыть каждую лунку **4 раза тщательно с 300 мкл** промывочного буфера. Высушить постукиванием перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
8. Внести **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку.
9. Выдержать в течение **30 мин при КТ (20-25 °С)** на орбитальном шейкере (около 600 оборотов в минуту).
10. Удалить или аспирировать содержимое лунок и промыть каждую лунку **4 раза тщательно с 300 мкл** промывочного буфера. Высушить постукиванием перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
11. Внести **100 мкл субстрата** в каждую лунку и инкубировать в течение **20-30 мин при КТ (20-25 °С)** на орбитальном шейкере (около 600 оборотов в минуту). **Избегайте воздействия прямых солнечных лучей!**
12. Добавить **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку и встряхнуть планшет для обеспечения гомогенного распределения раствора.
13. Измерить оптическую плотность раствора в лунках в течение 10 минут с помощью планшетного ридера при 450 нм и длине волны между 620 нм и 650 нм.

### 6.4 Иммуноферментный анализ Норметанефрина

1. Внести **50 мкл Рабочего Буфера** в соответствующие лунки Планшета Норметанефрина.
2. Внести **25 мкл чистого супернатанта от стандартов, контролей и образцов** в лунки.
3. Внести по **25 мкл Ацилирующего раствора** (см. пункт 6.1) во все лунки.  
**Ацилирующий реагент стабилен максимум 3 минуты.**
4. Инкубировать в течение **15 мин при КТ (20-25 °С)** на орбитальном шейкере (около 600 оборотов в минуту).
5. Внести **50 мкл Антисыворотки Норметанефрина** во все лунки.
6. Закрывать планшет **Пленкой**, встряхнуть в течение **1 минуты при КТ (20-25 °С)** на орбитальном шейкере и выдержать в течение **15 - 20 часов** (на ночь) при температуре **2-8 °С**.
7. Снять фольгу и выбросить. Удалить или аспирировать содержимое лунок и промыть каждую лунку **4 раза тщательно с 300 мкл** промывочного буфера. Высушить постукиванием перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
8. Внести **100 мкл ферментного конъюгата** в каждую лунку.
9. Выдержать в течение **30 мин при КТ (20-25 °С)** на орбитальном шейкере (около 600 оборотов в минуту).
10. Удалить или аспирировать содержимое лунок и промыть каждую лунку **4 раза тщательно с 300 мкл** промывочного буфера. Высушить постукиванием перевернутым планшетом по впитывающей бумаге.
11. Внести **100 мкл субстрата** в каждую лунку и инкубировать в течение **20-30 мин при КТ (20-25 °С)** на орбитальном шейкере (около 600 оборотов в минуту). **Избегайте воздействия прямых солнечных лучей!**
12. Добавить **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку и встряхнуть планшет для обеспечения гомогенного распределения раствора.
13. Измерить оптическую плотность раствора в лунках в течение 10 минут с помощью планшетного ридера при 450 нм и длине волны между 620 нм и 650 нм.

## 7. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

| Стандарт                | Концентрации стандартов  |     |     |      |      |       |
|-------------------------|--|-----|-----|------|------|-------|
|                         | A  | B   | C   | D    | E    | F     |
| Норметанефрин (пг/мл)   | 0  | 48  | 160 | 480  | 1600 | 4800  |
| Норметанефрин (пмоль/л) | 0  | 262 | 874 | 2620 | 8740 | 26200 |
| Метанефрин (пг/мл)      | 0  | 36  | 120 | 360  | 1200 | 3600  |
| Метанефрин (пмоль/л)    | 0  | 183 | 608 | 1830 | 6080 | 18300 |
| Перевод единиц          | Норметанефрин (пг/мл) × 5,46 = норметанефрин (пмоль/л)<br>Метанефрин (пг/мл) × 5,07 = метанефрин (пмоль/л) |     |     |      |      |       |

Калибровочная кривая может быть получена путем откладывания оптической плотности (рассчитайте среднюю оптическую плотность) стандартов (линейно, ось y) против соответствующих стандартных концентраций (логарифмические, ось x).  
Использовать нелинейную регрессию для кривой (напр., сплайн, 4 - параметр, Акима).

Концентрации **образцов и контролей** можно считать непосредственно со стандартной кривой.

Образцы с концентрацией выше, чем самый высокий стандарт (Стандарт F) должны быть разбавлены соответственно со Стабилизирующим реагентом, который должен быть повторно анализирован.

#### 7.1 Контроль качества

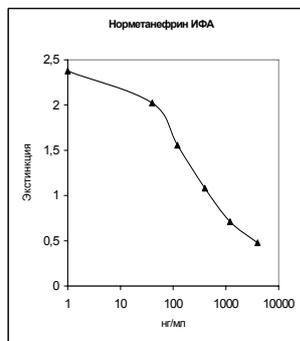
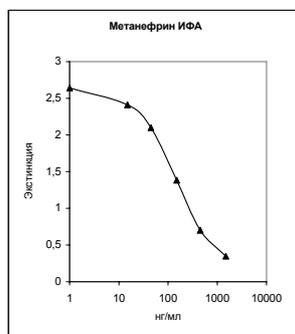
Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормативами. Используйте контроли как с нормальными, так и с патологическими уровнями. Концентрации контролей DRG и других коммерческих контролей не должны выходить за рамки заданных диапазонов. Заданные диапазоны контролей DRG указаны в листе контроля качества (QC Report).

#### 7.2 Калибровка

Связывание антисывороток и конъюгатов фермента, а также активность использованного фермента являются термозависимыми, 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 °С.

*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 Типичные калибровочные кривые** для ИФА определения метанефрина и норметанефрина. Пожалуйста, не используйте эти кривые для определения концентраций метанефрина и норметанефрина в образцах.



## 8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Ожидаемые значения

|               |                   |                      |
|---------------|-------------------|----------------------|
|               | <b>Метанефрин</b> | <b>Норметанефрин</b> |
| <b>Плазма</b> | < 90 пг/мл        | < 180 пг/мл          |

### Аналитическая Чувствительность (Предел обнаружения)

|               |                   |                      |
|---------------|-------------------|----------------------|
|               | <b>Метанефрин</b> | <b>Норметанефрин</b> |
| <b>Плазма</b> | 17 пг/мл          | 23 пг/мл             |

### Аналитическая специфичность (Перекрестная реактивность)

#### Метанефрин

| Соединение                     | Перекрестная реакция (%) |
|--------------------------------|--------------------------|
| Метанефрин                     | 100                      |
| Норметанефрин                  | 0,04                     |
| 3-Метокситирамин               | <0,001                   |
| Адреналин                      | <0,001                   |
| Норадреналин                   | <0,001                   |
| Дофамин                        | <0,001                   |
| Ванилиновая манделовая кислота | <0,001                   |
| Гомованилиновая кислота        | <0,001                   |
| L-допа                         | <0,001                   |
| L-тирозин                      | <0,001                   |
| Тирамин                        | <0,001                   |

#### Норметанефрин

| Соединение                     | Перекрестная реакция (%) |
|--------------------------------|--------------------------|
| Норметанефрин                  | 100                      |
| Метанефрин                     | 0,08                     |
| 3-Метокситирамин               | 1,74                     |
| Адреналин                      | <0,001                   |
| Норадреналин                   | <0,001                   |
| Дофамин                        | <0,001                   |
| Ванилиновая манделовая кислота | <0,001                   |
| Гомованилиновая кислота        | <0,001                   |
| L-допа                         | <0,001                   |
| L-тирозин                      | <0,001                   |
| Тирамин                        | <0,001                   |

### Точность

| <i>Вариабельность в пределах постановки</i> |         |                 |        | <i>Вариабельность между постановками</i> |         |                 |        |
|---|---------|-----------------|--------|--|---------|-----------------|--------|
|   | Образец | Диапазон, пг/мл | КВ (%) |  | Образец | Диапазон, пг/мл | КВ (%) |
| <b>Метанефрин</b>                           | 1       | 155±17          | 11     | <b>Метанефрин</b>                        | 1       | 133±13          | 10     |
|   | 2       | 245±28          | 11     |  | 2       | 257±23          | 8.9    |
|   | 3       | 523±38          | 7.3    |  | 3       | 528±50          | 9.5    |
| <b>Норметанефрин</b>                        | 1       | 167±12          | 7.3    | <b>Норметанефрин</b>                     | 1       | 161±18          | 11     |
|   | 2       | 373±29          | 7.8    |  | 2       | 370±19          | 5.1    |
|   | 3       | 832±60          | 7.2    |  | 3       | 844±51          | 6.0    |

### Линейность

|                      |        | Диапазон | Разведение | Диапазон, % |
|----------------------|--------|----------|------------|-------------|
| <b>Метанефрин</b>    | Плазма | 41-2100  | 1:65       | 109         |
| <b>Норметанефрин</b> | Плазма | 58-5800  | 1:129      | 109         |

### Восстановление

|                      |        | Среднее значение, % | Диапазон, % | % Восстановления после насыщения |
|----------------------|--------|---------------------|-------------|----------------------------------|
| <b>Метанефрин</b>    | Плазма | 97                  | 85-111      |                                  |
| <b>Норметанефрин</b> | Плазма | 92                  | 80-108      |                                  |

### Сравнение с другим методом анализа LC-MS/MS

|                      |        |                           |                  |
|----------------------|--------|---------------------------|------------------|
| <b>Метанефрин</b>    | Плазма | LC-MS/MS = 1.1 ИФА – 19.4 | r = 0.98; n = 59 |
| <b>Норметанефрин</b> | Плазма | LC-MS/MS = 1.2 ИФА + 10.5 | r = 0.99; n = 59 |



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

