

# НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВАНІЛІЛМІНДАЛЬНОЇ КИСЛОТИ (ВМК)

## 408-1050, Immunoplate VMA

Каталог. № : 408-1050

Методика від 02-2013

Кількість : 96

Виробник : BSM Diagnostics (США)



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

### ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для кількісного виміру *in vitro* концентрації ванілілміндалльної кислоти (ВМК) в сечі пацієнта.

### КОРОТКИЙ ОПИС І ПОЯСНЕННЯ

(Див. оригінал інструкції).

### ПРИНЦИП МЕТОДУ

Набір для визначення ВМК використовує твердофазовий імуноферментний аналіз, заснований на конкуренції між ВМК на стінках мікропланшетів і в сечі за моноклональними антитілами. Основні кроки такі:

- 1) Додавання зразків і реакція: Зразки інкубуються в лунках з пероксидазою хрому, кон'югованою з анти-ВМК моноклональними антитілами.
- 2) Промивання: нез'язані ВМК і антитіла, пов'язані з ВМК з сечі, видаляються промиванням 0.9% розчином NaCl.
- 3) Ферментна реакція (розвиток забарвлення): Кількість пов'язаної пероксидази обернено пропорційна концентрації ВМК, присутньої в зразку сечі. При додаванні субстрату (ТМБ) розвивається блакитне забарвлення, яке змінюється на блакитне при додаванні стоп-розчину. Його інтенсивність обернено пропорційна концентрації ВМК в калібраторі або зразку сечі.
- 4) Зчитування оптичної щільності: Після додавання стоп-розчину вимірюється оптична щільність при 450 нм. З калібральної кривої визначається концентрація невідомого зразка.

### РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

- 1) Мікропланшет з привитою ВМК, 96 лунок
- 2) Анти-ВМК-ферментний кон'югат: пероксидаза хрому, кон'югована з анти-ВМК моноклональними антитілами, 10 мл
- 3) ВМК/ГВК реагент для розвитку забарвлення: розчин тетраметилбензидину (20 мл)
- 4) ВМК/ГВК стоп-розчин: 2 N сірчана кислота (20 мл)
- 5) Набір стандартів ВМК: 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 1, 2, 4 і 8 мкг/мл у фосфатному буфері, 0.01M, pH 7.4 (по 1 мл кожний).

### НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАВЛЯЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- 1) Мікропланшетний рідер з фільтром на 450 нм
- 2) pH метр або pH-папір з діапазоном 5.0-10.0
- 3) Мікропіпетки з наконечниками на 10, 50 і 100 мкл
- 4) Мікропіпетки з наконечниками на 50 і 100 мкл
- 5) Циліндри на 10 і 100 мл
- 6) Серологічні піпетки на 10 мл
- 7) Одноразові пробірки або судини
- 8) Розчин 5N NaOH
- 9) Розчин 5N HCl
- 10) Мікропланшетний вошер (опція)
- 11) Мікропланшетний інкубатор (опція)
- 12) Хлорид натрію або сольовий розчин
- 13) 0.01 M фосфатно-сольовий буфер, pH 7.4

### ПІДГОТОВКА ДО АНАЛІЗУ

- 1) Приготувати 0.01 M фосфатний сольовий буфер, pH 7.4. Цей розчин використовується для розведення невідомих зразків перед аналізом.
- 2) Перед аналізом приведіть всі зразки сечі і реагенти до кімнатної температури (15-30 °C) і добре перемішайте.
- 3) Приготуйте все реагенти і зразки сечі перед початком аналізу. Для отримання хороших результатів процедура аналізу повинна бути виконана без пауз.

### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набір призначений для діагностики *in vitro*.
2. Компоненти набору розроблені як єдине ціле.
3. Компоненти з різних лотів не повинні змішуватися.
4. Не використовуйте калібратори набору для інших цілей, наприклад, для ВЕРХ.
5. Для запобігання забруднень використовуйте новий наконечник для кожного калібратора або проби сечі.

### ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

1. Зберігати набір при 2-8 °C в холодильнику.
2. Стрипи потрібно зберігати в закритому пакеті з осушувачем. Виймайте плашку тільки коли необхідно.
3. Терміни придатності реагентів вказані на етикетках. Розчин, що розвиває забарвлення, повинен бути безбарвним.
4. Захищайте реагенти і реакційні суміші від потрапляння прямих сонячних променів.

### ЗБІР І ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

Повинна бути відібрана проба 24-годинної сечі з 10 мл 6N HCl в якості консерванту. Випадково відібрані проби повинні бути доведені до pH між 2 і 3 негайно після відбору. Запишіть загальний об'єм, і збережіть 1-5 мл для аналізу ВМК і загального креатиніну. Всі зразки мають бути в холодильнику перед тестуванням. Центрифугуйте каламутні зразки сечі або проби з кристалами або осадами.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

#### А. Приготування реагентів

- 1) Промивний розчин: розчиніть 9 г NaCl в 1 літрі дистильованої або деіонізованої води. Також може бути використаний сольовий розчин.

#### В. Приготування зразків

- 1) Візьміть 1 мл підкисленої сечі і перенесіть в одноразову мікропробірку, в якій буде встановлюватися необхідний pH.
- 2) Приведіть pH всіх зразків в діапазон від 6 до 9, додаючи маленькі кількості 5N NaOH (наприклад, по 5 мкл), контролюючи pH на pH-метрі або pH-папірцем.
- 3) Розбавте приготовані таким чином зразки у співвідношенні 1:10 фосфатно-сольовим буфером. pH розбавлених зразків повинен бути між 7 і 8.

#### С. Стандартна процедура аналізу

- 1) Приготуйте робочий листок з розташуванням стандартів і зразків (рис. 1).
- 2) Додавання зразків:
  - a. Додайте 50 мкл калібраторів ВМК у відповідні лунки.
  - b. Додайте 50 мкл розбавлених (1:10) контролів або зразків у відповідні лунки.
- 3) Додавання анти-ВМК-ферментного кон'югата: Додайте 50 мкл анти-ВМК ферментного кон'югату в кожну лунку, використовуючи диспенсер.
- 4) Реакція антиген-антитіло: Перемішайте плашку пересуванням її взад-вперед в слабкому горизонтальному русі протягом однієї хвилини. Для цих цілей може бути використаний мікропланшетном шейкер. Дозвольте плашці постояти при кімнатній температурі (15-30 °C) протягом однієї години.
- 5) Промивання: **Промивати тільки один раз.** Видаліть інкубаційну суміш декантацією плашки в раковину і промокніть плашку фільтрувальним папером. Розкачайте 300 мкл сольового розчину в кожну лунку. Видаліть розчин декантацією плашки в раковину і промокніть плашку фільтрувальним папером. Промивка може бути зроблена також на мікропланшетному вошері.
- 6) Ферментна реакція: Додайте 100 мкл ВМК/ГВК реагенту, що розвиває забарвлення, в кожну лунку і дозвольте постояти протягом 25 хвилин при 15-30 °C.
- 7) Припинення утворення забарвлення: Додайте 100 мкл ВМК/ГВК стоп-розчину в кожну лунку.
- 8) Вимірювання оптичної щільності: Може бути використаний будь-який рідер з довжиною хвилі 450 нм.

#### Д. Розрахунок результатів

- 1) Використовуючи логарифмічний або напівлогарифмічний папір побудуйте калібрвальну криву, відкладаючи по осі абсцис концентрацію ВМК, а по осі ординат - оптичну щільність. Концентрації ВМК в невідомих зразках обчислюються за цією кривою.

Приклад:

Зразок	Опт. Щільність	Співвідношення В/В <sub>0</sub> (%)	ВМК мкг/мл
Стандарти			
0 мкг/мл	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	
Проба А	1.229 1.218	82.9	0.072 x 10
Проба В	0.769 0.746	51.3	0.285 x 10
Проба С	0.522 0.522	35.4	0.600 x 10

Результати, представлені вище, показують концентрацію ВМК в мкг/мл. Якщо потрібна загальна кількість ВМК в 24-годинній пробі:

$$\frac{\text{ВМК (мкг/мл)} \times \text{об'єм сечі (мл)}}{1000} = \text{ВМК, мг/24 години}$$

або коли потрібно відношення ВМК/креатинін:

$$\frac{\text{ВМК (мкг/мл)}}{[\text{Креатинін (мг/дл)}]/100} = \text{ВМК мкг/мг Креатиніну}$$

або = ВМК мг/г Креатиніну

2) Розрахунок може бути проведений на комп'ютері з використанням калібрувальної кривої, заснованої на 4 коефіцієнтах log-logit.

Всі наведені дані надаються виключно для наочності і не можуть бути використані для побудови калібрувальної кривої.

#### ЗАУВАЖЕННЯ ПО МЕТОДИЦІ

- Дуже важливо промивати мікролунки ретельно, видаляючи з них весь залишок рідини.
- Піпетувати калібратори або зразки сечі на дно кожної лунки. Перемішування лунок після кожного піпетування не вимагається.
- Оптична щільність - функція часу інкубації і температури. Отже, необхідно забезпечити однаковий час інкубації без пауз.

#### ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Набір призначений тільки для кількісного виміру ВМК у сечі.
- Всі зразки з концентрацією ВМК більше, ніж 8 мкг/мл, повинні бути проаналізовані повторно з великим розведенням, наприклад 1:20.
- Вплив азиду натрію: Так як азид натрію уповільнює ферментну реакцію, будь-який буфер, що містить азид натрію в якості консерванту, не повинен використовуватися для розведення зразків сечі.

#### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для моніторингу за якістю набору рекомендується, щоб контрольні матеріали (наприклад, фірми Bio-Rad) включалися в кожну постановку аналізу.

#### ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень відповідно до характеристик населення, яке тестується. Значення, наведені нижче, отримані для зразків 24-годинної сечі, зібраної від 280 пацієнтів у США.

	ВМК мг/день	ВМК мг/г креатиніну
Кількість зразків	280	280
Середнє (X)	7.92	6.87
± 2 S.D. діапазон	0.40-15.44 (мал. 2)	0.00-14.37 (мал. 3)

Виміряна кількість ВМК (мг/день)

Мал. 2. Розподіл ВМК, виділеного за день, у 280 нормальних пацієнтів.

Виміряна кількість ВМК (мг/г креатиніну)

Мал. 3. Розподіл концентрації ВМК у 280 нормальних пацієнтів.

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

##### Відновлення

а. До чотирьох зразків сечі здорових пацієнтів додавалася ВМК в різних концентраціях. Результати показані в таблиці.

	Ендог. (мкг/мл)	Добавка (мкг/мл)	Очікуване (мкг/мл)	Отримане (мкг/мл)	Відновлення (%)
<b>A</b>	1.76	0.00			
	0.88	9.60	10.48	10.10	192
	1.32	4.80	6.12	5.92	97
	1.54	2.40	3.94	3.90	99
	1.65	1.20	2.85	2.78	98
<b>B</b>	6.16	0.00			
	3.08	9.60	12.68	12.85	101
	4.62	4.80	9.42	9.55	101
	5.39	2.40	7.79	8.00	102
	5.77	1.22	6.97	7.29	104
<b>C</b>	11.71	0.00			
	5.85	9.60	15.45	15.85	102
	8.78	4.80	13.58	18.77	101
	10.24	2.40	12.64	12.61	99
	10.98	1.20	12.18	13.30	109
<b>D</b>	8.43	0.00			
	4.21	9.60	13.81	15.14	109
	6.32	4.80	11.12	11.34	102
	7.37	2.40	9.77	10.34	105
	7.90	1.20	9.10	9.27	101

#### Лінійність

Чотири зразки сечі і два контролю Біо-Рад були розбавлені сольовим фосфатним буфером.

Було обчислено співвідношення ( / В) для кожного розведення (В) до опт. щільності 0 стандарту, дані показані на графіку. (Мал. 4)

Мал. 4. Тест на лінійність. (Див. Оригінал інструкції)

#### Відтворюваність

а. Коефіцієнт варіації всередині серії визначався для трьох зразків сечі з різними концентраціями ВМК:

	зразок А	зразок В	зразок С
кількість	26	24	24
середнє (мкг/мл)	0.192	8.25	11.24
S.D. (мкг/мл)	0.06	0.52	0.71
коэф. вар. (%)	6.0	6.3	6.0

б. Коефіцієнт варіації між серіями визначався для трьох зразків сечі з різними концентраціями ВМК:

	зразок А	зразок В	зразок С
кількість	16	19	19
середнє (мкг/мл)	1.193	2.821	9.698
S.D. (мкг/мл)	0.086	0.232	0.686
коэф. вар. (%)	5.7	8.2	7.1

#### Специфічність

Наступні речовини були оцінені на перехресні реакції до набору. Відсоток перехресних реакцій виражається в термінах відсоткової концентрації кожної речовини, яка дає 50% заміщення.

Речовина	% перехр. реакцій
ВМК	100
Гомованілінова кислота	< 0.01
DL-3,4-дигідроксиміндална кислота	4
DL-3,4-дигідроксифенилоцтова кислота	< 0.01
Метанефрин	< 0.01
Ванілілпуриева кислота	4
Ванільна кислота	< 0.01
Допамін	< 0.01
5-гідрокси-3-індооцтова кислота	< 0.01
Ванілілмолочна кислота	< 0.01
3-метокси-4-гідроксифенилглікол	< 0.01

#### Чутливість

Чутливість цього тесту вище, ніж 0.0625 і оцінюється в 0.035 мкг/мл. Мінімальна концентрація, яка визначається, розрахована як концентрація ВМК, яка відповідає оптичній щільності на 2 стандартних відхилення від значення оптичної щільності 20 визначень 0 стандарту.

#### Стабільність зразків

Стабільність була перевірена на двох різних зразках сечі, один з яких зберігався при 4 °С, а інший при -20 °С. Результати показали, що проби можна зберігати при 4 °С, принаймні, 5 днів, а при -20 °С - 50 днів.



**ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР**

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 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)