

Кат Комбі ІФА

Ручний та автоматичний ферментний імунологічний аналіз для in vitro-діагностики
Кількісне визначення адреналіну та норадреналіну в плазмі і сечі людини.

REF RE59242

 **96**

   **2-8°C**

EU: **IVD**  



I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Гамбург, Німеччина

Телефон: +49 (0)40-53 28 91-0
Факс: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,
тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

1. ОЧІКУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Ручний та автоматизований імуноферментний аналіз для діагностичного кількісного визначення *in vitro* Адреналін і норадреналін в плазмі та сечі людини.

2. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ І ПОЯСНЕННЯ

Катехоламіни адреналіну, норадреналіну та допаміну синтезуються в наднирковій мозковій оболонці, симпатичній нервовій системі і в мозку. Вони впливають практично на всі тканини і залучаються разом з іншими гормональними та нейрональними системами при регуляції широкого спектру фізіологічних процесів.

Оскільки катехоламіни та їх метаболіти метанефрин та норметанефрин секретуються у зростаючих кількостях в ряді захворювань, їх можна використовувати для діагностичних цілей.

У цьому контексті діагностика та спостереження за захворюваннями пухлини нервової системи є особливо важливими. Це стосується в першу чергу феохромоцитом, але також нейроblastом і гангліоневроми.

Через етап вилучення на початку аналізу, клієнт може використовувати всі види тваринного матеріалу. Він працює для щурів, мишей та інших. Хімічна структура катехоламінів ідентична у всіх тварин.

3. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА) базується на основі сендвіч-принципу. Лунки покриті козячим антитілом проти кроликів. Додане рідке антитіло, спрямоване на епітоп антигену молекули зв'язується з пластиною протягом інкубаційного часу. Антиген зразка інкубували в покритих лунках з кон'югованим ферментом другим антитілом (Е-Ab), спрямованим до іншої області антигенної молекули. Після реакції субстрату інтенсивність розробленого кольору пропорційна кількості антигену. Результати зразків можна визначити безпосередньо, використовуючи стандартну криву.

4. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАХОДИ

1. Для діагностичного використання *in-vitro* тільки. Тільки для професійного використання.
2. Перед початком аналізу прочитайте інструкцію повністю та уважно. Використовуйте дійсну версію інструкції, вкладену в набір. Будьте впевнені, що все зрозуміло.
3. У випадку серйозного пошкодження пакета набору, будь ласка, зв'яжіться з IBL або постачальником у письмовій формі, не пізніше ніж через тиждень після отримання набору. Не використовуйте пошкоджені компоненти під час тестування, але зберігання безпечно для вирішення питань, пов'язаних із скаргою.
4. Перевірте номер лоту та термін придатності. Не змішувати реактиви різних партій. Не використовуйте реактиви з вичерпаним терміном придатності.
5. Дотримуйтесь належної лабораторної практики та правил техніки безпеки. Одягайте латексні рукавички, одноразові латексні рукавички та захисні окуляри, де це необхідно.
6. Реактиви цього комплекту, що містить небезпечний матеріал, можуть спричинити подразнення очей та шкіри. Дивіться МАТЕРІАЛИ, що постачаються та етикетки для деталей. Паспорти безпеки матеріалів для цього продукту доступні на [IBLHomePage](#) або за запитом безпосередньо від IBL.
7. Хімікати та підготовлені або використані реактиви повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до національного законодавства щодо біологічно небезпечних речовин та правил техніки безпеки.
8. Персонал прибиральників повинен керуватися професійними пам'ятками щодо потенційних небезпек і поводження.
9. Уникайте контакту з Стоп розчином. Це може викликати подразнення шкіри та опіки.
10. Всі реактиви цього комплекту, що містять людську сироватку або плазму, були протестовані та були визнані негативними для Анти-VІІ I / II, HBsAg і анти-HCV. Проте наявність цих чи інших інфекційних агентів не може бути виключена абсолютно. З цієї причини реактиви слід розглядати як потенційно біологічно небезпечні у використанні та для утилізації.

5. ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ

Комплект постачається при температурі навколишнього середовища і повинен зберігатись при 2-8 ° С. Тримайте подалі від нагрівання або прямого сонячного світла. Зберігання та стабільність зразків та підготовлених реагентів зазначено у відповідних главах. Стріпи мікропланшета стабільні до зазначеного закінчення терміну придатності після розкриття набору. Переконайтеся, що розкритий пакет щільно закритий та зберігається при температурі 2-8 ° С.

6. ЗАБІР ЗРАЗКІВ ТА ЗБЕРІГАННЯ

На вивільнення катехоламіну та метанефрину *in vivo* впливають кілька продуктів харчування та ліків.

Вітамін В, кава і банани, альфа - метилдопа, інгібітори MAO та COMT, а також препарати, пов'язані з гіпертензією, слід припинити, принаймні, протягом 72 годин до забору зразка.

Плазма (EDTA)

Зразки крові слід зберігати при 2-8 ° С до центрифугування, щоб відокремити плазму протягом 2 годин після збору крові.

Звичайних запобіжних заходів для венепункції слід дотримуватись. Важливо зберегти хімічну речовину зразка крові цілісною від моменту його збирання до аналізу. Не використовувати грубо гемолітичні, жовтянисті або грубо липемічні зразки. Зразки, що з'являються мутними, повинні бути центрифуговані перед аналізом для видалення будь-яких частинок матеріалу.



Зберігання:	2-8 °	≤ 20 ° С (роздрібнені)	Тримайте подалі від нагрівання або прямих сонячних променів. Уникайте повторних циклів заморожування-розмороження. Транспортувати зразки замороженими.
Стабільність :	6 годин	1 місяць	

Сеча

Можливо використовувати як спонтанну, так і 24 годинну сечі. Загальний обсяг сечі, що виділяється протягом 24 годин, повинен бути зібраний та змішаний в одній пляшці, що містить 10-15 мл 6 N HCl як консервант. Визначте загальний об'єм для підрахунку результатів. Змішати та центрифугувати зразки перед використанням у дослідженні.

Зберігання:	≤ 20 ° С (роздрібнені)	Тримайте подалі від нагрівання або прямих сонячних променів. Уникайте повторних циклів заморожування-розмороження.
Стабільність :	6 місяців	

7. МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

	Реагенти, забезпечені цим набором, достатні для 96 екстракцій за одиничним визначенням у підготовці зразка (екстракції): 88 проб пацієнтів, 6 стандартів та 2 контролю. Кожен витяг є достатнім для одного визначення адреналіну та норадреналіну в імуноферментним аналізі.
	Мікропланшет може бути використаний для адреналіну та норадреналіну.

Кількість	позначення	компонент
2x12x8	MTP	Мікропланшет Стріпи, що розламуються. Покритий анти-кролячим IgG (коза, поліклональний)
1x6x2,5 мл	CALA-F	Стандарт А-Ф Адреналін:0;1,5;5,0;15;50;150 нг/мл (0;8;27;82;273;819 нмоль/л) Норадреналін : 0;5,0;15;50;150 нг/мл (0;30;89;296;887;2955 нмоль/л) Допамін: 0;6;180;585;2300;11470 нг/мл (0;392;1175;3819;15014;74876 нмоль/л) Готовий до використання. Містить : [-] Адреналін, [-] Норадреналін [-] Допамін (біологічно активний), 0,1 М НСІ
1x2x2,5 мл	CONTROL 1+2	Контроль 1+2 Готовий до використання. Містить: [-] адреналін, [-] норадреналін, [-] дофамін (біологічно активний), 0,1 М НСІ. Концентрація / прийнятні діапазони див. сертифікат QC.
2x400 мкл	ENZCONJ CONC	Ферментний кон'югат (Концентрат кон'югату ферменту (50x) Містить стрептавідину лужну фосфатазу, Трис буфер, НСІ, 0,01% NaN ₃
4x	EXTRPLATE	Макропланшет (пластина екстракції) 24 лунки, кожна покрита Борнатовим спорідненим гелем.
2x60 мл	EXTRBUF	Буфер екстракції. Рожевий колір. Готовий до використання. Містить: 0,016% NaN ₃
4x1,25 мл	COMT LYO	COMT ліофілізований Містить : катехол-О-метилтрансфераза (свиняча печінка), NaN ₃
4 x 1,25 мл	COENZ	Коензим розчин. Готовий до використання. Містить: S-аденозил-L-метіонін, стабілізатори.
2x3 мл	ENZBUF	Ферментний буфер. Готовий до використання. Містить : Трис буфер, НСІ, стабілізатори.
1 x 100 мл	RELEASEBUF	Звільняючий буфер Окрашений жовтим. Готовий до використання. Містить : 0,1 М НСІ, індикатор.
2 x 3 мл	ACYLREAG	Реагент для ацилювання . Готовий до використання. Містить : диметилформамід, етанол. Обережно! Токсичний, надзвичайно легкозаймистий
2 x 100 мл	WASHBUF CONC	Промивний буфер концентрат (10x) Містить: Трис-буфер, НСІ, Tween, 0,2% NaN ₃
1 x 2 мл	COMT ADD	COMT добавки Містить : людська плазма, стабілізатори, 0.01% тімеросал
1 x 8.0 мл	ANTISERUM AD	Адреналін анти сироватка. Окрашена зеленим. Готова до використання. Містить : антитіла проти адреналіну (кролика), буфер, стабілізатори
1 x 8.0 мл	ANTISERUM NAD	Норадреналін анти сироватка Окрашена синім. Готова до використання. Містить: антитіла проти адреналіну (кролика), буфер, стабілізатори
2 x 25 мл	ПНФФ SUBS	SUBS ПНФФ розчин субстрату. Готовий для використання. Містить: р-нітрофенілфосфат (ПНФФ)
2 x 15 мл	ПНФФ STOP	ПНФФ стоп розчин Готовий до використання. Містить: р-нітрофенілфосфат (ПНФФ)
6x	фольга	Клейка фольга

8. МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ



1. Мікропіпетки (Multipette Eppendorf або подібні пристрої, <3% CV).
Обсяг: 10; 10-100; 100-1000 мкл
2. Орбітальний шейкер (200-900 об / хв.) (Наприклад, EAS 2/4, SLT)
3. Міксер вихровий
4. 8-канальна мікропіпетка з резервуаром реагентів
5. Промивна пляшка, автоматична або напіваавтоматична система промивки мікропланшетів.
6. Мікропланшетний рідер, здатний читати абсорбцію при 405 нм (еталонна довжини хвилі 600-650 нм)
7. Бідистильована або дейонізована вода.
8. Паперові рушники, наконечники для піпетки та таймер.
9. Одноразові пробірки для розведення зразків.
10. 0,1 М HCl для розведення зразку (сечі)

9. ПРОЦЕДУРА ПРИМІТКИ

1. Будь-яке неправильне поводження із зразками або модифікація процедури випробувань може вплинути на результати. Вказані обсяги піпетування, періоди інкубації, температури та етапи попередньої обробки повинні виконуватися суворо відповідно до інструкцій. Використовуйте лише калібровані піпетки та прилади.
2. Як тільки тест буде розпочато, всі кроки повинні бути завершені без перерви. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої приготовлені в належний час. Дозвольте всім реагентам та зразкам досягати кімнатної температури (18-25 ° C) і обережно прокрутити кожен ампулу рідкого реагенту та зразок перед використанням. Змішувати реагенти без піноутворення.
3. Уникайте забруднення реагентів, піпеток і лунок / пробірок Використовуйте нові одноразові наконечники для піпетки для кожного компонента та зразка. Не обмінюйте ковпачки. Завжди закривайте флакони, що не використовуються. Не використовуйте повторно лунки / пробірки або реагенти.
4. Деякі компоненти містять 250 мкл розчину. Будьте обережні, щоб розчин був повністю на дні флакона перед відкриттям.
5. Рекомендується визначити зразки в двох примірниках, щоб мати змогу виявити потенційні помилки в прокапуванні.
6. Використовуйте схему піпетування для перевірки відповідного макета пластини. Схема піпетування, яка охоплює обидві обробки зразка та аналіз, доступна на IBL-Homepage.
7. Час інкубації впливає на результати. Всі лунки повинні оброблятися в однаковій послідовності порядку та часу. Рекомендується використовувати 8-канальну мікропіпетку для піпетування розчину в усі лунки.
8. Промивка мікропланшету є важливою. Неправильно промиті лунки дадуть помилкові результати. Рекомендується використовувати багатоканальну піпетку або автоматичну систему промивки мікропланшетів. Не дозволяйте лункам висихати між інкубаціями. Не подряпайте покриті лунки під час промивання та аспірації. Промийте і заповніть всі реагенти з обережністю. Під час промивання перевірте, чи всі лунки рівномірно наповнені промивним буфером, і немає залишків у лунках.
9. Вологість впливає на покриті лунки / пробірки. Не відкривайте пакет, поки він не досягне кімнатної температури. Призначені лунки / пробірки повинні бути негайно повернені до закритого пакету, включаючи осушувач.

10. РУЧНА ПРОЦЕДУРА

10.1. ПРЕДТЕСТОВА ІНСТРУКЦІЯ З НАЛАШТУВАННЯ

	вміст набору для 192 визначень можна розділити на 2 окремі прогони
	Видимі кількості гелю можна відокремити від поверхні екстракційної пластини під час екстракції. Це не впливає на результати випробувань.
	Забруднення повітря пероксидним киснем, який містять дезінфікуючі засоби для чищення поверхонь або обладнання, що використовує порошок або розчини, наприклад VIRKON® , слід уникати у будь-якому випадку. Вони будуть сильно порушувати результати аналізу. VIRKON® є торговою маркою DuPont.

10.1.1. Розведення зразків.


Зразки, що підозрюються, що містять концентрації вище вищого стандарту, слід розбавити таким чином:

зразок	До розведення	з	зауваження
Плазма	Найвищого стандарту	Бідистильованою водою	до етапу екстракції
Сеча	Найвищого стандарту	0.1 N HCl	до етапу екстракції

10.1.2. Екстракція зразків, стандартів та контролів (пластини екстракції) (ручна версія).

1. Прокапати 20 мкл кожного зразка стандарту, контролю та зразка сечі та 500 мкл кожного зразка плазми у відповідні лунки екстракційної пластини. Додайте 500 мкл бідистильованої води до всіх лунок, за винятком зразків плазми для виправлення різниці об'ємів.
 2. Прокачайте 1000 мкл екстракційного буфера у кожен лунку.
 3. Покрийте клейкою фольгою. Витримати 30 хв при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (600-900 оборотів в хвилину) . Під час екстракції поверхня рідини повинна змочувати клейку фольгу, але рівень рідини не повинен перевищувати 2/3 лунок. Бризки не впливають на результат.
 4. Видаліть клейку фольгу. Негайно опорожніть пластину і видаліть залишкову рідину на паперовий рушник.
 5. Прокачайте в кожен лунку 2 мл бідистильованої води.
 6. Покрийте планшет з новою клейкою плівкою. Струшувати 5 хв при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (600-900 об / хв). Бризки не впливають на результат.
 7. Видаліть клейку фольгу. Негайно опорожніть пластину і видаліть залишкову рідину на паперовий рушник. Видаліть рідину повністю.
 8. Прокапати 150 мкл буфера екстракції у кожен лунку. До кожної лунки додають 50 мкл реагенту для ацилювання. Змішати негайно після піпетування.
 9. Екстракувати 20 хв при кімнатній температурі (18-25 ° C) (без клейкої фольги) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв) .
 10. Негайно опорожнити пластину і видаліть залишкову рідину на паперовий рушник. Видалити рідину повністю.
 11. Прокапати 2 мл бідистильованої води в кожен лунку.
 12. Покрити планшет новою клейкою плівкою. Струшувати 5 хв при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (600-900 обертів на хвилину). Бризки не впливають на результат.
 13. Видаліть клейку фольгу. Негайно опорожнити тарілку і видаліть залишкову рідину на паперовий рушник. Видаліть рідину повністю.
 14. Прокапати 300 мкл буфера для вивільнення в кожен лунку.
 15. Струшувати 30 хв при кімнатній температурі (18-25 ° C) (без клейкою фольги) на орбітальному шейкері (400-600 оборотів в хвилину) .
- Підготовлені зразки повинні бути проаналізовані в той же день. Якщо це неможливо, ви можете зберігати екстракційну пластину, покриту клейовою фольгою при 2-8 ° C протягом ночі.


10.1.3. Приготування ліофілізованих або концентрованих компонентів.

	Обсяги , зазначені нижче, за один прогін з 2 x 6 стріпами (2 x 48 визначень)
---	--

Розвести/ розчинити	компонент	з	розчинник	співвідноше ння	зауваження	зберігат и	стабільн ість
25 мл	WASHBU F CONC	225 мл	Бідистильована вода	1:10	Змішати енергійно	2-8°C	4 тижня
220 мкл	ENZCONJ CONC	11 мл	WASHBUF розведений	1:51	Приготувати свіжим і використовува ти тільки один раз. Змішати без піноутворення	18-25°C	5 годин

10.2. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ (ручна версія)

10.2.1. Підготовка СОМТ ферментного розчину.

	СОМТ розчин фермент має бути свіжоприготованим безпосередньо перед використанням.
Розчинити кожний компонент набору ліофілізованого СОМТ в 1,25 мл бідистильованої води і змішати розчинений СОМТ. * Потім прокапати 1,25 мл Коензим розчину з наступними 1,25 мл ферментного буфера і 0,40 мл СОМТ добавки до змішаного СОМТ флаконів з отриманням кінцевого обсягу 4,15 мл розчину ферменту СОМТ на флакон. Об'єднайте два (2) Флакони для 48 визначень адреналіну та 48 визначень норадреналіну. Розчин може бути мутним. Змішати без спінювання. Розчин СОМТ стабільний при кімнатній температурі протягом 1 години.	

* Якщо необхідна лише частина розчину СОМТ, решту СОМТ розчину слід негайно заморозити частинами при -20 ° С. Розчин СОМТ стабільний в цих умовах протягом 1-2 місяців.

10.2.2. Ферментна дериватизація зразків, стандартів та контролів (мікропланшет)



10.2.3. Для дослідження використання тканинних гомогенатів і супернатантів клітинної культури можуть бути надані загальні рекомендації :

Робота з клітинною культурою супернатантів залежить як від матриці, так і від очікуваних концентрацій:

відповідно до протоколу сечі (екстракція принаймні 20 мкл супернатанту) чутливість до адреналіну 0.3 нг / мл і для норадреналіну 0,6 нг / мл для розбавленого зразка можна очікувати. У випадку матриці з додаванням сироватки (ФКС), плазмовий протокол (екстракція 500 мкл супернатанту) може бути використаний з такими чутливими властивостями, що відповідають протоколу в плазмі (див. 16.Характеристики виконання). Для гомогенатів тканин для гомогенізації не слід використовувати перхлорну кислоту. Для отримання додаткової інформації зверніться до IBL.

10.2.4. Адреналін для сечі та плазми

1. Прокапати 75мкл свіжоприготованого ферментного розчину СОМТ в кожен лунку мікропланшета. Кратко струсність мікропланшет.
2. Прокапати 100 мкл кожного екстрагованого стандарту, контролю та зразка у відповідні лунки. Під час цього кроку тримайте наконечники піпетки безпосередньо в розчині СОМТ. Колір зміниться до рожевого кольору. Струсність коротко.
3. Прокапати 50мкл адреналіну антисироватки (зеленого кольору) у кожен лунку.
4. Покрийте клейкою фольгою. Інкубуйте 120 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° С) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв) .

10.2.5. Норадреналін для сечі та плазми.

1. Прокапайте 25мкл свіжоприготованого комбінованого ферментного розчину СОМТ у кожен лунку мікропланшета. Струсність пластину коротко.
2. Прокапайте 25мкл кожного екстрагованого Стандарту, Контролю та зразка у відповідні лунки. Під час цього кроку тримайте наконечники піпетки безпосередньо в розчині СОМТ. Колір зміниться до рожевого кольору. Струсність пластину коротко.
3. Прокапайте 50 мкл норадреналіну (синього кольору) у кожен лунку.
4. Покрити клейкою фольгою. Інкубуйте 120 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° С) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв).



10.2.6. ІФА

Для адреналіну та норадреналіну слід проводити наступну процедуру.

1. Видаліть клейку фольгу. Відкиньте інкубаційний розчин. Промивайте планшет 4 х з 250-300 мкл розбавленого промивного буфера. Видаліть надмірний розчин, торкнувшись перевернутою пластиною паперового рушника.
2. Прокапати 100мкл свіжоприготованого ферментного кон'югату в кожен лунку.
3. Покрити пластину новою клейкою плівкою. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі (18-25° С) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв).
4. Видаліть клейку фольгу. Видаліть інкубаційний розчин. Промивайте планшет 4 х з 250-300 мкл розбавленого промивного буфера. Видаліть надмірно розчин, натискаючи перевернутою пластиною на паперовий рушник.
5. Для додавання субстрату та стоп-розчину використовуйте, якщо доступно, 8-канальну мікропіпетку. Піпетування слід проводити в однакові інтервали часу для субстрату та стоп розчину. Використовуйте позитивне зміщення та уникайте утворення повітряних бульбашок.
6. Прокапати 200мкл розчину субстрату ПНФФ у кожен лунку.
7. Інкубуйте 40 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° С) (без клейкої фольги) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв) .
8. Зупиніть реакцію субстрату, додаючи до кожної лунки 50 мкл стоп розчину ПНФФ. Коротко змішуйте вміст, обережно струшуючи планшет.
9. Вимірюють оптичну густину фотометром при 405 нм (еталонна довжина хвилі: 620-650 нм) протягом 60 хвилин після піпетування стоп-розчину. Повітряні бульбашки повинні бути відсутні..

11. АВТОМАТИЧНА ПРОЦЕДУРА

11.1. ПРЕДТЕСТОВА ІНСТРУКЦІЯ З УСТАНОВКИ (автоматизована версія) .

	Вміст набору для 192 визначень можна розділити на 2 окремі прогони
	Видимі кількості гелю можна відокремити від поверхні екстракційної пластини під час екстракції. Це не впливає на результати випробувань.
	Повітряне забруднення пероксидним киснем, який містять дезінфікуючі засоби для очищення поверхонь або обладнання, що використовує порошок або розчини, наприклад VIRKON® ,слід уникати у будь-якому випадку. Вони будуть сильно порушувати результати аналізу. VIRKON® є торговою маркою DuPont

11.1.1. Розведення зразків

Зразки, що підозрюються, що містять концентрації вище найвищого стандарту, слід розбавити таким чином:

зразок	До розведення	з	зауваження
Плазма	> Найвищий стандарт	Бідистильована вода	до етапу екстракції
сеча	> Найвищий стандарт	0.1 N HCl	до етапу екстракції

11.1.2. Екстракція зразків, стандартів та контролів (пластина екстракції) (автоматизована версія)

1. Прокапайте 30 мкл кожного стандарту, контролю та зразків сечі і 750 мкл кожної проби плазми у відповідні лунки екстракційної пластини. Додайте 750 мкл бідистильованої води в усі лунки, за винятком зразків плазми для коректування різниці обсягів.
2. Прокапати 1000 мкл екстракційного буфера у кожну лунку.
3. Покрийте з клейкою фольгою. Екстрагувати 30 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (600-900 об / хв). Під час екстрагування поверхню рідини слід накрити клейкою фольгою, але рівень рідини не повинен перевищувати 2/3 лунки. Бризки не впливають на результати.
4. Видаліть клейку фольгу. Негайно опорожнити пластину і видаліть залишкову рідину на паперовий рушник.
5. Прокапати 2 мл бідистильованої води в кожну лунку.
6. Покрити новою клейкою плівкою. Струсіть 5 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (600-900 об / хв). Бризки не впливає на результати.
7. Видаліть клейку фольгу. Негайно опорожнити пластину і видалити залишкову рідину на паперовий рушник. Видалити рідину повністю.
8. Прокапайте 150 мкл екстракційного буфера у кожну лунку. До кожної лунки додають 50 мкл реагенту для ацилювання. Змішайте відразу після піпетування.
9. Екстрагувати 20 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) (без клейкої фольги) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв).
10. Негайно опорожнити пластину і видалити залишкову рідину на паперовий рушник. Видалити рідину повністю.
11. Прокапати 2 мл бідистильованої води в кожну лунку.
12. Накрийте пластину з новою клейкою плівкою. Струсіть 5 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (600-900 об / хв). Бризки не впливають на результати.
13. Видаліть клейку фольгу. Негайно опорожнити тарілку і видаліть залишкову рідину на паперовий рушник. Видалити рідину повністю.
14. Прокапайте 450 мкл звільняючого буфера для вивільнення в кожну лунку.
15. Струсіть 30 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) (без клейкої фольги) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв).

Підготовлені зразки слід аналізувати в той же день. Якщо це неможливо, ви можете зберегти екстракційну пластину, покриту клейкою фольгою при 2-8 ° C протягом ночі.

11.1.3. Підготовка ліофілізованих або концентрованих компонентів



Розвеси/розчинити	компонент	з	розчинник	співвідношення	зауваження	зберігання	стабільність
50 мл	WASHBUF CONC	450 мл	Бідистильована вода	1:10	Змішати енергійно	2-8°C	4 тижня
300 мкл	ENZCONJ CONC	15 мл	WASHBUF розведений	1:51	Підготувати свіжим і використовувати лише один раз. Змішати без спінювання.	18-25°C	5 годин

11.2. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ (автоматизована версія)

11.2.1. Підготовка СОМТ ферментний розчин



Перед застосуванням СОМТ ферментний розчин повинен бути свіжоприготованим перед використанням.

Розчиніть кожен компонент набору ліофілізованого СОМТ у 1,25 мл бідистильованої води і перемішати розчинений СОМТ. * Потім прокачайте 1,25 мл ферментного розчину, потім 1,25 мл ферментного буфера і 0,40 мл СОМТ добавки до змішаних флаконів СОМТ для отримання кінцевого об'єму 4,15 мл СОМТ розчину ферменту у флаконі.

Об'єднайте два (2) флакони для 48 визначень адреналіну та 48 визначень норадреналіну.

Розчин може бути мутний. Змішати без спінювання. Розчин СОМТ стабільний при кімнатній температурі протягом 1 години.

* Якщо потрібна лише частина розчину СОМТ, решта СОМТ-розчину має бути замороженою негайно в частинах при -20 ° С. Розчин СОМТ стабільний в цих умовах протягом 1-2 місяців.

11.2.2. Для досліджень використання тканинних гомогенатів і клітинної культури супернатантів загальна рекомендація може бути надана:

Робота з клітинною культурою супернатантів залежить від матриці, а також від очікуваних концентрацій:

Відповідно до протоколу сечі (екстракція принаймні 20 мкл супернатанту) чутливість до адреналіну 0,3 нг / мл та до норадреналіну 0,6 нг / мл для розбавленого зразка може бути очікувана. У випадку матриці з додаванням сироватки (FCS), плазмовий протокол (екстракція 500 мкл супернатанту) може бути використаний з чутливістю, що відповідає плазмовому протоколу (див. 16. Характеристики

виконання).

Для гомогенатів тканин для гомогенізації не слід використовувати перхлорну кислоту. За додатковою інформацією звертайтеся до IBL.

11.2.3. Ферментативна дериватизація зразків, стандартів та контролів (мікропланшет)

11.2.4. Адреналін для сечі та плазми

1. Прокапайте 75мкл свіжоприготованого СОМТ ферментного розчину у кожен лунку мікропланшета. Струсніть пластину 1 хв.
2. Прокапати 100 мкл кожного екстрагованого Стандарту, Контролю та зразка у відповідні лунки. Струсніть пластину 1 хв.
3. Прокапайте 50 мкл адреналіну (зеленого кольору) у кожен лунку.
4. Покрийте пластину. Інкубувати 120 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв).

11.2.5. Норадреналін для сечі та плазми

1. Прокапайте 25мкл свіжоприготованого СОМТ ферментного розчину у кожен лунку мікропланшета. Струсити планшет 1 хв.
2. Прокапати 25 мкл кожного екстрагованого Стандарту, Контролю та зразка у відповідні лунки. Струсніть пластину 1 хв.
3. Прокапайте 50 мкл норадреналіну (синього кольору) у кожен лунку.
4. Покрийте пластину. Інкубувати 120 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв).

11.2.6. ІФА (автоматизована версія)

Для адреналіну та норадреналіну слід виконати наступну процедуру.

1. Видаліть інкубаційний розчин. Промивайте планшет 6 x з 250-300 мкл розбавленого промивного буфера.
2. Прокапайте 100 мкл ферментного кон'югату в кожен лунку.
3. Покрийте пластину. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв).
4. Видаліть інкубаційний розчин. Промивайте планшет 6 x з 250-300 мкл розбавленого промивного буфера.
5. Піпетування слід проводити за однакових інтервалів часу для субстрату та стоп розчину.
6. Прокапайте 200 мкл розчину субстрату ПНФФ у кожен лунку.
7. Інкубуйте 40 хвилин при кімнатній температурі (18-25 ° C) на орбітальному шейкері (400-600 об / хв). Якщо температура в автоматі перевищує 25 ° C, скоротити час інкубації до 30 хв, щоб уникнути переповнення сигналу.
8. Зупиніть реакцію субстрату, додавши до кожної лунки 50мкл ПНФФ стоп-розчину. Коротко змішайте вміст, акуратно струшуючи пластину.
9. Вимірювати оптичну густину фотометром при 405 нм (еталонна хвиля довжина: 620-650 нм) в межах 60 хвилин після піпетування стоп-розчину

12. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Результати випробувань є дійсними лише тоді, коли тест було виконано відповідно до інструкцій. Крім того, усі користувачі суворо дотримуються правил НЛП (Належної лабораторної практики) належної лабораторної практики або порівнянних стандартів / законів. Користувач та / або лабораторія повинні мати перевірену систему для отримання діагнозу відповідно до GLP. Всі контролі повинні бути знайдені в межах прийнятної діапазону, як зазначено на етикетках та сертифікаті якості. Якщо критерії не виконуються, пробіг недійсний, і його слід повторити. Кожна лабораторія повинна використовувати відомі зразки в якості додаткового контролю. Рекомендуються взяти участь у відповідній оцінці якості випробувань. В разі будь-яких відхилень наступні технічні питання повинні бути доведені: дати закінчення терміну дії (отриманих) реагентів, умови зберігання, піпетки, прилади, умови інкубування і методи промивки.

13. Обчислення результатів

Отримані ОГ стандартів (по осі Y, лінійна) наведені в залежності від їх концентрації (вісь X, логарифмічна) або на полу-логарифмічному графічному папері або за допомогою автоматизованого методу. Хороший результат забезпечується CubicSpline, 4 Logisitics Параметр або логіт -Log. Для розрахунку стандартної кривої, застосовують кожен сигнал стандартів. Концентрація набору контролів і зразків сечі можна зчитувати безпосередньо з відповідної стандартної кривої. Через обсяг піпетування 500 мкл (автоматизована версія: 750 мкл) для плазми в порівнянні до 20 мкл (автоматизована версія: 30 мкл) для стандартів, результати для зразків плазми повинні бути розділені на 25. Для одиниць в пг / мл, будь ласка, помножити на 1000.

В випадку розбавлених зразків значення повинні бути помножені на відповідні коефіцієнти розведення. Зразки, що показують концентрації вище найвищого стандарту повинні бути розведені, як описано в інструкції перед тестовою установкою і повторно аналізовані.

Розрахунок 24 г екскреції сечі для кожного зразку:

$$\text{мкг} / 24 \text{ год} = \text{мкг} / \text{л} \times \text{л} / 24 \text{ г}$$

Конверсія :

$$1000 \text{ пг} / \text{мл} = 1 \text{ нг} / \text{мл}$$

$$\text{Адреналін (мкг} / \text{л)} \times 5,458 = \text{нмоль} / \text{L}$$

$$1000 \text{ пг} / \text{мл} = 1 \text{ нг} / \text{мл}$$

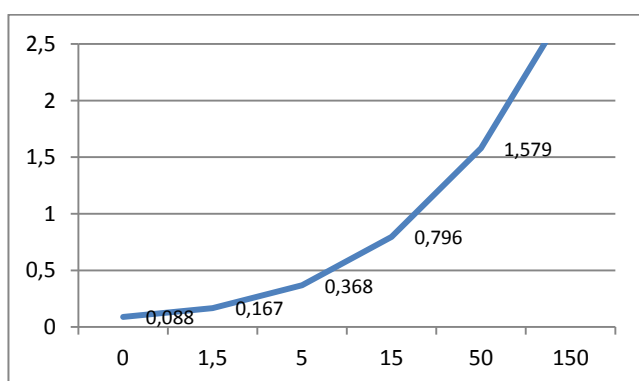
$$\text{Норадреналін (мкг} / \text{л)} \times 5,911 = \text{нмоль} / \text{л}$$

Типова калібрувальна крива

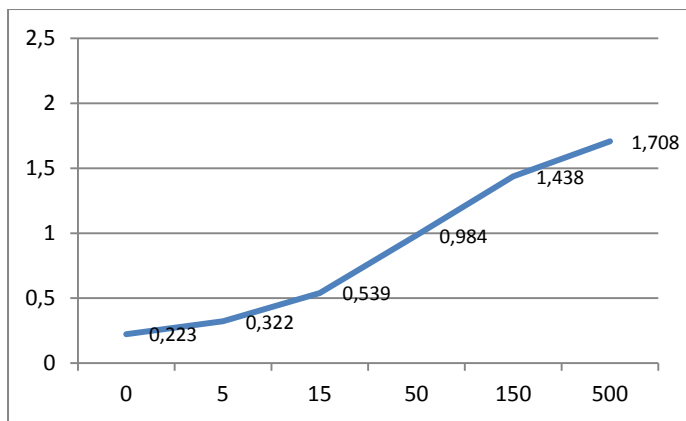
(Приклад. не слід використовувати для розрахунку!)

стандарт	Адреналін (нг/мл)	ОГ (середня)	ОГ/ОГмакс (%)
A	0.0	0.088	3.1
B	1.5	0.167	5.8
C	5.0	0.368	12.8
D	15	0.796	27.6
E	50	1.579	54.8
F	150	2.881	100

Кат Комбі (адреналін)



стандарт	Адреналін (нг/мл)	ОГ (середня)	ОГ/ОГмакс (%)
A	0.0	0.223	0.0
B	5.0	0.322	6.7
C	15	0.539	21.3
D	50	0.984	51.2
E	150	1.438	81.8
F	500	1.708	100
Кат Комбі норадреналін			



2

14. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Самі по собі результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Вони повинні бути співвіднесені з іншими клінічними спостереженнями і діагностичними тестами. Вочевидь здорові випробовувані показують такі значення: (5% - 95% процентиль) Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала свій власний діапазон нормальних значень.

	сеча		плазма	
	Мкг/д	Нмоль/д	Пг/мл	Нмоль/л
адреналін	< 20	< 110	< 125	< 0,68
норадреналін	< 90	< 535	< 600	< 3,55

15. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Збір зразків і зберігання істотно впливають на результати випробувань . Див ЗРАЗКИ ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ для деталей. Для перехресних реакцій, див. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ. Наступні компоненти крові не роблять істотного ефекту (+/- 20% від очікуваного) за результатами випробувань до величин нижче зазначених концентрацій: Гемоглобін 2,0 мг / мл

Білірубін 1,0 мг/мл

Тригліцерид 91 Мг / мл

16.ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ









Аналітична специфічність (перехресна реактивність)	Речовина	адреналін	норадреналін	Перехресна реактивність інших субстанцій проаналізованих < 0.4 %	
		адреналін	100		< 0.02
		норадреналін	< 0.4		100
		метанефрин	< 0.1		< 0.002
Аналітична чутливість (ліміт визначення)	адреналін	сеча	0,2 нг/мл	Середній сигнал (стандарт 0)+2SD	
		плазма	8 пг/мл		
	норадреналін	сеча	0,6 нг/мл		
		плазма	20 пг/мл		
точність			Діапазон (нг/мл)	CV (%)	
В аналізі	адреналін	сеча	5.0 - 64.3	8,7	
		плазма	0.046 – 1.060	6,8	
	норадреналін	сеча	16.0 – 256	7,3	
		плазма	0.560 – 12.38	7,4	
Між	адреналін	сеча	5.2 - 74.5	12,1	

аналізами		плазма	0.051 – 0.979	15,2	
	норадреналін	сеча	15.4 – 391.5	12,1	
		плазма	0.569 – 1.945	12,5	
Лінійність			Діапазон (нг/мл)	Серійне розведення до	Діапазон (%)
	адреналін	сеча	2,7-114,6	1:32	85-105
		плазма	0,002-0,837	1:32	76-120
	норадреналін	сеча	5,1-423	1:32	85-115
		плазма	0,02-8,2	1:32	89-111
Хук-ефект не визначений.					
Відновлення			Середнє(%)	Діапазон (%)	% відновлення після збагачення
	адреналін	сеча	95	85-106	
		плазма	100	85-120	
	норадреналін	сеча	100,9	81-116	
		плазма	97,5	83-111	
Метод порівняння з HPLC	адреналін	IBL= 0.91 x HPLC + 14.0; r = 0.969; n = 120			
	норадреналін	IBL = 0.75 x HPLC + 4.8; r = 0.945; n = 134			

17. ЛІТЕРАТУРА

1. Rust MB, Faulhaber J et. al. Neurogenic Mechanisms Contribute to Hypertension in Mice with Disruption of the K-CL Cotransporter KCC3. Circulation Research, January (2006)
2. Creces J., Appleton Ch.: Catecholamines and their Metabolites: Evaluation of a commercial IFA. Clin. Biochem., QML Pathology, Brisbane QLD (2004)
3. Adams, J. M. et al. Effects of 17 β -Estradiol on hypoglycemia-induced increases in plasma catecholamines in the rat. Poster Society for Neuroscience, Annual Meeting, New Orleans (2003)
4. Westermann J, Hubl W, Kaiser N, Salewski L, Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method. Clin. Lab., 48: 61-71 (2002)


УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати поодаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред'явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОВОГО (-ИХ) НАБОРУ (ІВ) . ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

	IBL International GmbH	Тел .:	+ 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
	Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург,	E-MAIL:	IBL@IBL-International.com
	Німеччина	WEB:	http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua