Інструкція по застосуванню

IBL International GmbH Flughafenstraße 52 a 22335 Гамбург, Німеччина

тел. +49 (0) 40 53 28 91-0
Факс +49 (0) 40 53 28 91-11

IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

ІФА на норадреналін

Ручний та автоматизований імуноферментний аналіз для кількісного визначення норадреналіну (норадреналіну) у плазмі та сечі людини in vitro.

REF RE59261

Σ 96

2°C 8°C

EU: IVD CE

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

IBL International GmbH
Флюгафенштрассе, 52а 22335 Гамбург, Німеччина

Always there for you

1. ПЕРЕДБАЧУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Ручний та автоматизований імуноферментний аналіз для кількісного визначення норадреналіну (норадреналіну) у плазмі та сечі людини in vitro.

2. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ТА ПОЯСНЕННЯ

Катехоламіни адреналін, норадреналін і дофамін синтезуються в мозковій речовині надниркових залоз, симпатичній нервовій системі і в головному мозку. Вони впливають практично на всі тканини і разом з іншими гормональними та нейронними системами беруть участь у регуляції найрізноманітніших фізіологічних процесів.
Оскільки катехоламіни та їх метаболіти метанефрин і норметанефрин секретуються у зростаючих кількостях при ряді захворювань, їх можна використовувати для діагностичних цілей.
У цьому контексті особливого значення набуває діагностика та спостереження за пухлинними захворюваннями нервової системи. В першу чергу це стосується феохромоцитоми, а також нейробластоми та гангліоневроми.
Завдяки етапу екстракції на початку аналізу замовник може використовувати будь-які види тваринного матеріалу. Він працює для щурів, мишей та інших. Хімічна структура катехоламінів у всіх тварин однакова.

3. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА) за принципом сендвіча. Лунки покриті антитілами кози проти кролика. Додане рідке антитіло, спрямоване до епітопу молекули антигену, зв'язується з планшетом протягом часу інкубації. Антиген зразка інкубують у покритій лунці з другим антитілом, кон'югованим ферментом (E-Ab), спрямованим до іншої області молекули антигену. Після реакції субстрату інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену. Результати зразків можна визначити безпосередньо за допомогою стандартної кривої.

4. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

1. Тільки для діагностики in vitro. Тільки для професійного використання.
2. Перед початком аналізу повністю і уважно прочитайте інструкцію. Використовуйте дійсну версію інструкції, яка входить до набору. Будьте впевнені, що все зрозуміли.
3. У разі серйозного пошкодження упаковки комплекту, будь ласка, зв'яжіться з IBL або своїм постачальником у письмовій формі не пізніше одного тижня після отримання набору. Не використовуйте пошкоджені компоненти під час тестових запусків, але захищайте їх від проблем, пов'язаних зі скаргами.
4. Дотримуйтесь номера партії та терміну придатності. Не змішуйте реагенти різних партій. Не використовуйте прострочені реагенти.
5. Дотримуйтесь належної лабораторної практики та правил безпеки. Одягайте лабораторні халати, одноразові латексні рукавички та захисні окуляри, де це необхідно.
6. Реагенти цього набору, що містять небезпечні речовини, можуть викликати подразнення очей та шкіри. Додаткові відомості див. у розділі ПОСТАВЛЕНІ МАТЕРІАЛИ та етикетки. Листи даних про безпеку матеріалів для цього продукту доступні на домашній сторінці IBL або за запитом безпосередньо в IBL.
7. Хімічні речовини та підготовлені чи використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи відповідно до національних інструкцій або правил щодо біологічної небезпеки та безпеки.
8. Персонал, що прибирає, повинен керуватися професіоналами щодо потенційної небезпеки та поводження.
9. Уникайте контакту з стоп розчином . Це може викликати подразнення шкіри та опіки.
10. Усі реагенти цього набору, що містять сироватку або плазму людини, були перевірені та виявлені негативними на анти-ВІЛ I/II, HBsAg та анти-HCV. Однак наявність тих чи інших інфекційних агентів не може бути повністю виключена, і тому реагенти слід розглядати як потенційну біологічну небезпеку під час використання та утилізації.

5. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір поставляється при температурі навколишнього середовища та зберігається при температурі 2-8 °C. Зберігати подалі від тепла або прямих сонячних променів. Зберігання та стабільність зразка та підготовлених реагентів зазначено у відповідних розділах.

Стріпи мікропланшета стабільні до закінчення терміну придатності набору в зламаному, але щільно закритому пакеті при зберіганні при 2–8 °C.

6. Збір та зберігання зразків

⚠	На вивільнення катехоламінів і метанефринів in vivo впливають деякі продукти харчування та ліки. Вітамін B, кава та банани, альфа-метилдопа, інгібітори MAO та COMT, а також ліки, пов'язані з гіпертензією, слід припинити щонайменше за 72 години до забору зразків.

плазма (EDTA)

⚠	Зразок крові слід зберігати при 2-8°C до центрифугування для відділення плазми протягом 2 год після забору крові.

Слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів для венепункції. Важливо зберегти хімічну цілісність зразка крові з моменту його забору до моменту аналізу. Не використовуйте сильногемолітичні, жовтяничні або сильно ліпемічні зразки. Зразки, які виглядають каламутними, слід центрифугувати перед тестуванням для видалення будь-яких частинок.

Зберігання:	2-8°C	-20°C (аліквоти)	Зберігати подалі від тепла або прямих сонячних променів. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Транспортувати зразки замороженими.
Стабільність:	6 годин	1 місяць	

Сеча

Можна використовувати як спонтанну, так і 24-годинну сечу. Загальний об'єм сечі, що виділяється за 24 години, слід зібрати та змішати в одній пляшці, що містить 10-15 мл 6 N HCl як консервант. Визначте загальний обсяг для розрахунку результатів. Змішайте та центрифугуйте зразки перед використанням у аналізі.

Зберігання:	-20°C (аліквоти)	Зберігати подалі від тепла або прямих сонячних променів. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.
Стабільність:	6 місяців	

7. МАТЕРІАЛИ НАДАНІ

⚠	Реагентів, що постачаються з цим набором, достатньо для проведення до 48 одноразових визначень під час процедури екстракції (6 стандартів, 2 контролі, 40 зразків пацієнтів) і до 48 повторень в ІФА для кожного адреналіну та норадреналіну в плазмі та сечі. Додаткові реагенти доступні за запитом.

Кількість	символ	Компонент
1 x 12 x 8	MTP	**Мікропланшет** Розбірні стріпи. Покритий антикролячим IgG (козячий, поліклональний).
1 x 6 x 2,5 мл	CAL AF	**Стандарт A-F** 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; 500 нг/мл (0; 30; 89; 296; 887; 2955 нмоль/л) Дофамін: 0; 60; 180; 585; 2300; 11470 нг/мл(0; 392; 1175; 3819; 15014; 74876 нмоль/л) Готовий до використання. Містить: [-] адреналін, [-] норадреналін, [-] дофамін (біологічно активний), і 0,1 M HCl.
1 x 2 x 2,5 мл	КОНТРОЛЬ 1+2	**Контроль 1+2** Готовий до використання. Містить: [-] адреналін, [-] норадреналін, [-] дофамін (біологічно активний), 0,1 M HCl. Точні концентрації дивіться на етикетках флаконів або в сертифікаті контролю якості.
1 x 400 мкл	ENZCONJ КОНЦ	**Ферментний кон'югат** Концентрат (50x) Містить: стрептавідин лужну фосфатазу, трис-буфер, HCl, 0,01 % NaN_3.
2 x	EXTRPLATE	**Планшет для екстракції** (Макропланшет) По 24 лунки. Покритий боронатним афінним гелем.
1 x 60 мл	EXTRBUF	**Буфер екстракції** Рожевий колір. Готовий до використання. Містить: 0,016 % NaN_3.
2 x 1,25 мл	COMT LYO	**COMT** ліофілізований Містить: катехол-О-метилтрансферазу (печінка свиней), NaN_3.
2 x 1,25 мл	COENZ	**Розчин коферменту** Готовий до використання. Містить: S-Аденозил-L-метіонін, стабілізатори.
1 x 3 мл	ENZBUF	**Ферментний буфер** Готовий до використання. Містить: Трис-буфер, HCl, стабілізатори.
2 x 13 мл	RELEASEBUF	**Буфер вивільнення** Жовтий колір. Готовий до використання. Містить: 0,1 M HCl, індикатор.
1 x 3 мл	ACILREAG	**Реагент для ацилювання** Готовий до використання. Містить: диметилформамід, етанол. Обережно! Токсичний. Дуже легкозаймистий.
1 x 100 мл	WASHBUF КОНЦ	**Буфер для промивання** Концентрат (10x) Містить: Трис-буфер, HCl, Твін, 0,2 % NaN_3.

Кількість	символ	Компонент
1 x 2 мл	COMT ДОД	**Добавка COMT** Містить: плазму людини, стабілізатори, 0,01 % тимеросал.
1 x 8,0 мл	ANTISERUM NAD	**Норадреналін антисироватка** Синього кольору. Готовий до використання. Містить: антитіла проти норадреналіну (кролик), буфер, стабілізатори.
1 x 25 мл	ПНПП СУБ	**Розчин субстрату ПНФФ** Готовий до використання. Містить: п-нітрофенілфосфат (PNPP).
1 x 15 мл	AEC СТОП	**Рішення зупинки AEC** Готовий до використання. Містить: 1 M NaOH, 0,25 M EDTA.
3 x	Фольга	**Клейка фольга**

8. МАТЕРІАЛИ ПОТРІБНІ, АЛЕ НЕ НАДАНІ

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. Вихровий змішувач
4. 8-канальна мікропіпетка з резервуарами для реагентів
5. Пляшка для миття, автоматизована або напівавтоматична система промивання мікропланшетів
6. Рідер мікропланшетів, здатний зчитувати поглинання при 405 нм (еталонна довжина хвилі 600-650 нм)
7. Бідистильована або дейонізована вода
8. Паперові рушники, наконечники для піпеток і таймер
9. Одноразові пробірки для розведення зразків
10. 0,1 M HCl, для розведення зразка (сеча)

9. ПРИМІТКИ ДО ПРОЦЕДУРИ

1. Будь-яке неправильне поводження зі зразками або модифікація процедури випробування може вплинути на результати. Зазначені об'єми піпетування, час інкубації, температури та етапи попередньої обробки повинні виконуватися строго відповідно до інструкцій. Використовуйте тільки калібровані піпетки та прилади.
2. Після того, як тест було розпочато, усі кроки слід виконати без перерв. Переконайтеся, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої підготовлені у відповідний час. Дайте всім реагентам і зразкам досягти кімнатної температури (18-25 °C) і обережно покрутіть кожен флакон з рідким реагентом і зразком перед використанням. Змішувати реагенти без утворення піни.
3. Уникайте забруднення реагентів, піпеток і лунок/пробірок. Використовуйте нові одноразові пластикові наконечники для піпеток для кожного компонента та зразка. Не міняйте ковпачки місцями. Завжди закупорювати невикористані флакони. Не використовуйте повторно лунки/пробірки чи реагенти.
4. Деякі компоненти містять 250 мкл розчину. Перед відкриттям подбайте про те, щоб розчин повністю потрапив на дно флакона.
5. Рекомендується визначати зразки в двох примірниках, щоб мати можливість ідентифікувати потенційні помилки піпетування.
6. Використовуйте схему піпетування, щоб перевірити відповідне розташування планшетів. Схема піпетування, яка охоплює як попередню обробку зразка, так і аналіз, доступна на веб-сторінці IBL-Homepage.
7. Час інкубації впливає на результати. Усі лунки слід обробляти в однаковій послідовності . Для піпетування розчинів у всі лунки рекомендується використовувати 8-канальну мікропіпетку.
8. Миття мікропланшетів має важливе значення. Неправильно промиті лунки дадуть помилкові результати. Рекомендується використовувати багатоканальну піпетку або автоматичну систему промивання мікропланшетів. Не дозволяйте лункам висихати між інкубаціями. Не дряпайте покриті лунки під час промивання та аспірації. Обережно промийте та заповніть усі реагенти. Під час промивання перевірте, щоб усі лунки були рівномірно заповнені промивним буфером і щоб в лунках не було залишків.
9. Вологість впливає на покриті лунки/пробірки. Не відкривайте пакет, поки він не досягне кімнатної температури. Невикористані лунки/пробірки слід негайно повернути в повторно запечатаний пакет, включаючи осушувач.

10. РУЧНА ПРОЦЕДУРА

10.1. ІНСТРУКЦІЇ З ПЕРЕДТЕСТОВОГО НАЛАШТУВАННЯ

	Вміст набору для 96 визначень можна розділити на 2 окремі цикли.
⚠	**Під час екстракції з поверхні планшету для екстракції можна відокремити видимі кількості гелю. Це не впливає на результати аналізу.**
⚠	**Забруднення повітря дезінфікуючими засобами, що містять перекис, для очищення поверхонь або обладнання, що використовується у вигляді порошку або розчину, наприклад VIRKON®в будь-якому випадку слід уникати. Вони будуть сильно порушувати результати аналізу.**ВІРКОН® є торговою маркою DuPont.

10.1.1. Розведення зразків

Зразки, у яких є підозра, що вони містять концентрації вище найвищого стандарту, повинні бути розведені таким чином:

Зразок	розбавляти	з	Зауваження
плазма	> найвищий стандарт	бідист. вода	перед етапом екстракції
Сеча	> найвищий стандарт	0,1 N HCl	перед етапом екстракції

10.1.2. Екстракція проб, стандартів і контролю (планшет для екстракції) (ручна версія)

1.	Внесіть піпеткою по 20 мкл кожного стандарту, контролю та зразка сечі та 500 мкл кожного зразка плазми у відповідні лунки планшета для екстракції. Додайте 500 мкл бідисту. води до всіх лунок, крім зразків плазми, щоб виправити різницю об'ємів.
2.	У кожну лунку внесіть піпеткою 1000 мкл буфера для екстракції.
3.	Накрийте планшет клейкою фольгою. Екстрагують 30 хв при кімнатній температурі (18-25°C) на орбітальному шейкері (600-900 об/хв). Під час екстракції поверхня рідини повинна змочувати клейку фольгу, але рівень рідини не повинен перевищувати 2/3 лунки. Розбризкування не впливає на результати.
4.	Зніміть клейку фольгу. Негайно спорожніть планшет та видаліть залишки рідини на паперовому рушнику.
5.	У кожну лунку внесіть піпеткою 2 мл води бідистильованої.
6.	Накрийте плашет новою клейкою плівкою. **Струшувати 5 хв** при КТ (18-25°C) на орбітальному шейкері (600-900 об/хв). Розбризкування не впливає на результати.
7.	Зніміть клейку фольгу. Негайно спорожніть планшет та видаліть залишки рідини на паперовому рушнику. Повністю видалити рідину.
8.	У кожну лунку внесіть піпеткою 150 мкл буфера для екстракції. У кожну лунку додайте 50 мкл реагенту для ацилювання. Змішайте відразу після піпетування.
9.	**Витяг 20 хв** при КТ (18-25°C) (без клейкої фольги) на орбітальному шейкері (400-600 об/хв).
10.	Негайно спорожніть планшет та видаліть залишки рідини на паперовому рушнику. Повністю видалити рідину.
11.	Додайте піпеткою 2 мл бідист. води в кожну лунку.
12.	Накрийте планшет новою клейкою плівкою. Струшувати 5 хв при кімнатній температурі (18-25°C) на орбітальному шейкері (600-900 об/хв). Розбризкування не впливає на результати.
13.	Зніміть клейку фольгу. Негайно спорожніть планшет та видаліть залишки рідини на паперовому рушнику. Повністю видалити рідину.
14.	Внесіть піпеткою 300 мкл буфера для вивільнення в кожну лунку.
15.	**Струшувати 30 хв** при КТ (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 зберігати екстракційний планшет, накриту клейкою фольгою, при 2-8°C протягом ночі.

10.1.3. Приготування концентрованих компонентів

⚠	Нижче наведені обсяги для одного запуску з 6 стріпами (48 визначень).

Розбавити / розчинити	Компонент	з	Розріджувач	Відношення	Зауваження	Зберігання	Стабільність
25 мл	WASHBUF КОНЦ	225 мл	бідист. вода	1:10	Інтенсивно перемішати.	2-8°C	4 тижні
120 мкл	ENZCONJ КОНЦ	6 мл	WASHBUF (розведений)	1:51	Готуйте свіжо і використовуйте тільки один раз. Перемішати без утворення піни.	18-25°C	5 годин

10.2. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ (ручна версія)

10.2.1. Приготування ферментного розчину COMT

⚠ **Розчин ферменту COMT необхідно свіжо приготувати безпосередньо (макс. 15 хв) перед використанням.**

Розчиніть кожен компонент набору ліофілізованого COMT в 1,25 мл бідисту. води та перемішайте розчинений COMT.*

Потім піпеткою внесіть 1,25 мл розчину коензиму, а потім 1,25 мл ферментного буфера та 0,40 мл добавки COMT до змішаних флаконів COMT, щоб отримати кінцевий об'єм 4,15 мл розчину ферменту COMT на флакон.

Використовуйте 1 флакон для 48 визначення норадреналіну. Якщо вимірюєте і адреналін, і норадреналін, об'єднайте два (2) флакони для 48 визначення адреналіну та 48 визначення норадреналіну. Розчин може бути каламутним. Перемішати без утворення піни.

* Якщо потрібна лише аліквота розчину COMT, решту розчину COMT слід негайно заморозити в аликвотах при -20°C. Розчин COMT стабільний за цих умов протягом 1-2 місяців.

10.2.2. Ферментативна дериватизація зразків, стандартів і контролю (мікропланшет)

⚠ Рекомендується починати з адреналіну, якщо вимірюють і адреналін, і норадреналін.
Якщо піпетувати з позитивним зміщенням, подайте залишкову рідину з кінчика піпетки назад у відповідні лунки планшету для екстракції, інакше екстрактів може бути недостатньо для визначення норадреналіну.
Корисно тримати витяжну планшет в похилому положенні.
Перед використанням мікропланшетів визначте та позначте лунки на вміст адреналіну та норадреналіну.

10.2.2.1. Для дослідження гомогенатів тканин і супернатантів клітинної культури можна дати загальні рекомендації:

Робота з супернатантами клітинної культури залежить від матриці, а також очікуваних концентрацій: згідно з протоколом сечі (екстракція не менше 20 мкл супернатанту) можна очікувати чутливість 0,6 нг/мл. У разі використання матриці з додаванням сироватки (FCS) можна використовувати протокол плазми (екстракція 500 мкл супернатанту) з чутливістю, що відповідає протоколу плазми (див. розділ 16. ХАРАКТЕРИСТИКА).
Для гомогенізації тканин не слід використовувати хлорну кислоту для гомогенізації. За додатковою інформацією звертайтеся до IBL.

10.2.2.2. Норадреналін для сечі та плазми

1.	Внесіть піпеткою 25 мкл свіжоприготованого розчину ферменту COMT в кожну лунку мікропланшета . Коротко струсіть планшет.
2.	Внесіть піпеткою 25 мкл кожного екстрагованого стандарту, контролю та зразка у відповідні лунки. Під час цього _____ кроку помістіть наконечники піпетки безпосередньо в розчин COMT. Колір змінюється на рожевий. Коротко струсіть планшет.
3.	У кожну лунку внесіть піпеткою 50 мкл антисироватки норадреналіну (синього кольору).
4.	Покрити планшет з клейкою фольгою. Інкубувати 120 хв при КТ (18-25°C) на орбітальному шейкері (400–600 об/хв).
5.	Зніміть клейку фольгу. Видаліть інкубаційний розчин. Промийте планшет 4 рази 250-300 мкл розведеного **Буферу для промивання.** Видаліть надлишки розчину, постукуючи перевернутим планшетом по паперовому рушнику.
6.	У кожну лунку внесіть піпеткою 100 мкл свіжоприготованого ферментного кон'югату.
7.	Покрити планшет з новою клейкою фольгою. Інкубуйте 60 хв при кімнатній температурі (18-25°C) на орбітальному шейкері (400–600 об/хв).
8.	Зніміть клейку фольгу. Викиньте інкубаційний розчин. Промийте планшет 4 рази 250-300 мкл розведеного **Буферу для промивання.** Видаліть надлишки розчину, постукуючи перевернутим планшетом по паперовому рушнику.

9.	Для додавання субстрату та стоп-розчину, якщо є, використовуйте 8-канальну мікропіпетку. Піпетування слід проводити через однакові проміжки часу для субстрату та стоп-розчину. Використовуйте позитивне зміщення та уникайте утворення бульбашок повітря.
10	У кожну лунку внесіть піпеткою 200 мкл розчину субстрату ПНФФ.
11.	**Інкубувати 40 хв** при КТ (18-25°C) (без клейкої фольги) на орбітальному шейкері (400-600 об/хв).
12.	Зупиніть реакцію субстрату, додавши 50 мкл стоп-розчину ПНФФ у кожну лунку. Коротко перемішати вміст, обережно струшуючи планшет.
13	**Виміряти** оптичну густину за допомогою фотометра при 405 нм (еталонна довжина хвилі: 620-650 нм) у межах **60 хв** після піпетування стоп-розчину. Не повинно бути видно бульбашок повітря.

11. АВТОМАТИЗОВАНА ПРОЦЕДУРА

11.1. ІНСТРУКЦІЇ З НАЛАШТУВАННЯ ПЕРЕДТЕСТУВАННЯ (автоматизована версія)

	Вміст набору для 96 визначень можна розділити на 2 окремі цикли.
⚠	**Під час екстракції з поверхні екстракційної пластини можна відокремити видимі кількості гелю.** **Це не впливає на результати тесту.**
⚠	**Забруднення повітря дезінфікуючими засобами, що містять перекисень, для очищення поверхонь або обладнання, що використовується у вигляді порошку або розчину, наприклад VIRKON®в будь-якому випадку слід уникати. Вони будуть сильно порушувати результати аналізу.**ВІРКОН® є торговою маркою DuPont.

11.1.1. Розведення зразків

Зразки, у яких є підозра, що вони містять концентрації вище найвищого стандарту, повинні бути розведені таким чином:

Зразок	розбавляти	з	Зауваження
плазма	> найвищий стандарт	бідист. вода	перед етапом екстракції
Сеча	> найвищий стандарт	0,1 N HCl	перед етапом екстракції

11.1.2. Екстракція проб, стандартів і контролю (планшет для екстракції) (автоматизована версія)

1.	Внесіть піпеткою по 30 мкл кожного стандартного, контрольного зразка та зразка сечі та 750 мкл кожного зразка плазми у відповідні лунки планшета для екстракції. Додайте 750 мкл бідистильованої. води до всіх лунок, крім зразків плазми, щоб виправити різницю об'ємів.
2.	У кожну лунку внесіть піпеткою 1000 мкл буфера для екстракції.
3.	Накрийте пластину клейкою фольгою. Екстрагують 30 хв при КТ (18-25°C) на орбітальному шейкері (600-900 об/хв). Під час екстракції поверхня рідини повинна змочувати клейку фольгу, але рівень рідини не повинен перевищувати 2/3 лунки. Розбризкування не впливає на результати.
4.	Зніміть клейку фольгу. Негайно спорожніть тарілку та видаліть залишки рідини на паперовому рушнику.
5.	У кожну лунку внесіть піпеткою 2 мл води бідистильованої.
6.	Накрийте планшет новою клейкою плівкою. **Струшувати 5 хв** при КТ (18-25°C) на орбітальному шейкері (600-900 об/хв). Розбризкування не впливає на результати.
7.	Зніміть клейку фольгу. Негайно спорожніть тарілку та видаліть залишки рідини на паперовому рушнику. Повністю видалити рідину.
8.	У кожну лунку внесіть піпеткою 150 мкл буфера для екстракції. У кожну лунку додайте 50 мкл реагенту для ацилювання. Змішайте відразу після піпетування.
9.	**Витяг 20 хв** при КТ (18-25°C) (без клейкої фольги) на орбітальному шейкері (400-600 об/хв).
10.	Негайно спорожніть тарілку та видаліть залишки рідини на паперовому рушнику. Повністю видалити рідину.
11.	Додайте піпеткою 2 мл бідистильованоъ. води в кожну лунку.
12.	Накрийте пластину новою клейкою плівкою. Струшувати 5 хв при КТ (18-25°C) на орбітальному шейкері (600-900 об/хв). Розбризкування не впливає на результати.
13.	Зніміть клейку фольгу. Негайно спорожніть планшт та видаліть залишки рідини на паперовому рушнику. Повністю видалити рідину.
14.	У кожну лунку внесіть піпеткою 450 мкл буфера для вивільнення.
15.	**Струшувати 30 хв** при КТ (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 зберігати планшет для екстракції, накритий клейкою фольгою, при 2-8°C протягом ночі.

11.1.3. Приготування концентрованих компонентів (автоматизований варіант)

⚠	Нижче наведені обсяги для одного запуску з 6 стріпами (48 визначень).

Розбавити / розчинити	Компонент	з	Розріджувач	Відношення	Зауваження	Зберігання	Стабільність
50 мл	WASHBUF КОНЦ	450 мл	бідист. вода	1:10	Інтенсивно перемішати.	2-8°C	4 тижні
190 мкл	ENZCONJ КОНЦ	9,5 мл	WASHBUF (розведений)	1:51	Готуйте свіжо і використовуйте тільки один раз. Перемішати без утворення піни.	18-25°C	5 годин

11.2. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ (автоматизована версія)

11.2.1. Приготування ферментного розчину COMT

Розчин ферменту COMT необхідно свіжо приготувати безпосередньо (макс. 15 хв) перед використанням.

Розчиніть кожен компонент набору ліофілізованого COMT в 1,25 мл бідистильованої. води та перемішайте розчинений COMT.*

Потім піпеткою внесіть 1,25 мл розчину коензиму, а потім 1,25 мл ферментного буфера та 0,40 мл добавки COMT до змішаних флаконів COMT, щоб отримати кінцевий об'єм 4,15 мл розчину ферменту COMT на флакон.

Використовуйте 1 флакон для 48 визначень норадреналіну. Якщо вимірюєте і адреналін, і норадреналін, об'єднайте два (2) флакони для 48 визначення адреналіну та 48 визначення норадреналіну. Розчин може бути каламутним. Перемішати без утворення піни.

* Якщо потрібна лише аліквота розчину COMT, решту розчину COMT слід негайно заморозити в аликвотах при -20°C. Розчин COMT стабільний за цих умов протягом 1-2 місяців.

11.2.1.1. Для дослідження гомогенатів тканин і супернатантів клітинної культури можна дати загальні рекомендації:

Робота з супернатантами клітинної культури залежить від матриці, а також очікуваних концентрацій: згідно з протоколом сечі (екстракція не менше 20 мкл супернатанту) можна очікувати чутливість 0,6 нг/мл. У разі використання матриці з додаванням сироватки (FCS) можна використовувати протокол плазми (екстракція 500 мкл супернатанту) з чутливістю, що відповідає протоколу плазми (див. розділ 16. ХАРАКТЕРИСТИКА).

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

11.2.1.2. Норадреналін для сечі та плазми

1.	Внесіть піпеткою 25 мкл свіжоприготованого розчину ферменту COMT в кожну лунку мікропланшета. Струшувати планшет 1 хв.
2.	Внесіть піпеткою 25 мкл кожного екстрагованого стандарту, контролю та зразка у відповідні лунки. Струшувати планшет 1 хв.
3.	У кожну лунку внесіть піпеткою 50 мкл антисироватки норадреналіну (синього кольору).
4.	Покрийте плашет. Інкубуйте 120 хв при кімнатній температурі (18-25°C) на орбітальному шейкері (400-600 об/хв).
5.	Викиньте інкубаційний розчин. Промийте планшет 6 разів 250-300 мкл розведеного промивного буфера.
6.	У кожну лунку внесіть піпеткою 100 мкл ферментного кон'югату.
7.	Покрийте планшет. Інкубуйте 60 хв при кімнатній температурі (18-25 °C) на орбітальному шейкері

	(400-600 об/хв).
8.	Видаліть інкубаційний розчин. Промийте планшет 6 разів 250-300 мкл розведеного промивного буфера.
9.	Піпетування слід проводити з однаковими інтервалами часу для субстрату та стоп-розчину.
10	У кожну лунку внесіть піпеткою 200 мкл розчину субстрату ПНФФ.
11.	**Інкубувати 40 хв**при КТ (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.***
12.	Зупиніть реакцію субстрату, додавши 50 мкл стоп-розчину ПНФФ у кожну лунку. Коротко перемішати вміст, обережно струшуючи планшет.
13	**Виміряти** оптичну густину за допомогою фотометра при 405 нм (еталонна довжина хвилі: 620-650 нм) у межах **60 хв** після піпетування стоп-розчину.

12. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Результати тесту дійсні лише в тому випадку, якщо тест було проведено відповідно до інструкцій. Крім того, користувач повинен суворо дотримуватися правил НЛП (Належна лабораторна практика) або порівнянних стандартів/законів. Користувач та/або лабораторія повинні мати перевірену систему для діагностики відповідно до НЛП. Усі елементи контролю набора повинні знаходитися в межах допустимих діапазонів, як зазначено на етикетках і в сертифікаті контролю якості. Якщо критерії не виконуються, запуск недійсний і його слід повторити. Кожна лабораторія повинна використовувати відомі зразки в якості додаткового контролю. Рекомендується брати участь у відповідних випробуваннях з оцінки якості.

У разі будь-якого відхилення необхідно довести наступні технічні проблеми: терміни придатності (підготовлених) реагентів, умови зберігання, піпетки, прилади, умови інкубації та методи промивання.

13. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Отримані ОГ стандартів (вісь Y, лінійні) наносять на графік проти їх концентрації (вісь x, логарифмічний) або на напівлогарифмічному міліметровому папері, або за допомогою автоматизованого методу. Гарне прилягання забезпечується кубічним сплайном, 4 параметрами Logisitcs або Logit-Log.

Для розрахунку стандартної кривої застосовують кожен сигнал стандартів.

Концентрацію Контролів набору і зразків сечі можна зчитувати безпосередньо з відповідної стандартної кривої. Через об'єм піпетування 500 мкл (автоматизована версія: 750 мкл) для плазми в порівнянні з 20 мкл (автоматизована версія: 30 мкл) для стандартів, результати для зразків плазми потрібно розділити на 25. Для одиниць у пг/ мл, будь ласка, помножте на 1000.

У разі розведених зразків значення потрібно помножити на відповідний коефіцієнт розведення.

Зразки, що показують концентрації вище найвищого стандарту, необхідно розвести, як описано в ІНСТРУКЦІЯХ З НАЛАШТУВАННЯ ПЕРЕДТЕСТУВАННЯ, та повторно проаналізувати.

Обчисліть 24-годинну екскрецію для кожного зразка сечі: мкг/24 год = мкг/л x л/24 год

Перетворення:

1000 пг/мл = 1 нг/мл

Норадреналін (мкг/л) x 5,911 = нмоль/л

Типова калібрувальна крива (норадреналін)

(Приклад. Не використовуйте для обчислень!)

Стандартний	Норадреналін (нг/мл)	$OD_{Середній}$	$OD/OD_{макс}$ (%)
A	0	0,223	0,0
Б	5	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

14. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Самі результати не повинні бути єдиною причиною будь-яких терапевтичних наслідків. Їх необхідно співвідносити з іншими клінічними спостереженнями та діагностичними тестами.
Начебто здорові суб'єкти демонструють такі значення: (5 % - 95 % процентиль)
Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала свій власний діапазон нормальних значень.

	Сеча		плазма	
	мкг/день	нмоль/д	пг/мл	нмоль/л
Норадреналін	< 90	< 535	< 600	< 3,55

15. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Збір зразків має значний вплив на результати тесту. Додаткову інформацію див. у розділі ЗБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗІВ.
Для перехресної реактивності див. ЕФЕКТИВНІСТЬ.
Наведені нижче компоненти крові не мають значного впливу (+/-20% від очікуваного) на результати аналізу до вказаних нижче концентрацій:

Гемоглобін	2,0 мг/мл
Білірубін	1,0 мг/мл
Тригліцериди	91 мг/мл

16 ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

Аналітична специфічність (перехресна реактивність)	Речовина	Норадреналін	Перехресна реактивність інших речовин перевірено < 0,02 %	
	Адреналін	< 0,02		
	Норадреналін	100		
	Метанефрин	< 0,002		
	Норметанефрин	< 0,005		
Аналітична чутливість (Межа виявлення)	Сеча	0,6 нг/мл	Середній сигнал (нульовий стандарт) + 2СВ	
	плазма	20 пг/мл		
Точність		Діапазон (нг/мл)	CV (%)	
Внутрішньо-аналіз	Сеча	16 – 256	7.3	
	плазма	0,560 – 12,83	7.4	
Міжпробірний аналіз	Сеча	15,4 – 391,5	12.1	
	плазма	0,569 – 1,945	12.5	
Лінійність		Діапазон (нг/мл)	Серійне розведення до	Діапазон (%)
	Сеча	5.1 - 423	1:32	85 – 115
	плазма	0,02 – 8,2	1:32	89 - 111
	Не виявлено ефекту гачка високої дози.			
Відновлення		Середнє (%)	Діапазон (%)	% Відновлення після стрибків
	Сеча	100.9	81 – 116	
	плазма	97.5	83 – 111	
Порівняння методів проти ВЕРХ	IBL = 0,75 x ВЕРХ + 4,8			r = 0,945; n = 134

17. ЛІТЕРАТУРА

1. Creces J., Appleton Ch.: Катехоламіни та їх метаболіти: Оцінка комерційного ІФА. Clin. Біохімія, QML Patology, Brisbane QLD (2004)
2. Westermann J, Hubl W, Kaiser N, Salewski L, Просте, швидке та чутливе визначення адреналіну та норадреналіну в сечі та плазмі за допомогою неконкурентного імуноферментного аналізу в порівнянні з методом ВЕРХ. Clin. лаб., 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 ВКАЗАНОГО (-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
Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург, Німеччина
Тел .: + 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
E-MAIL: IBL@IBL-International.com
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

IBL International GmbH
Флюгафенштрассе, 52а
22335 Гамбург, Німеччина
Телефон: +49(0)40-53 28 91-0
факс: +49(0)40-53 28 91-11
IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Always there for you