

Návod k použití  
RIA stanovení Plasmatických nefrinů  
(Nephrones plasma RIA)

## **RIA stanovení Metanefrinu-Normetanefrinu v plasmě**

### **1. Účel použití a princip testu**

<sup>125</sup>I – radioimunoanalýza pro kvantitativní stanovení volného metanefrinu a volného normetanefrinu v plasmě.

Nejdříve jsou precipitací z plasmy odstraněny plasmatické bílkoviny. Poté jsou metanefrin (metadrenalin) a normetanefrin (normetadrenalin) kvantitativně acylovány.

Základní princip stanovení spočívá v radioimunoanalýze, při které dochází ke kompetitivní reakci radioaktivního a neradioaktivního antigenu s omezeným počtem vazebných míst protilátky. Množství antigenu značeného <sup>125</sup>I navázaného na protilátku je nepřímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Po dosažení rovnováhy je radioaktivita navázaná na protilátku vysrážena druhou protilátkou za přítomnosti polyethylen glykolu. Sraženina je poté změřena gama-čítačem. Kvantifikace neznámých vzorků je provedena srovnáním jejich aktivity s referenční křivkou sestavenou pomocí známých kalibrátorů.

Antiséra použitá v této soupravě rozpoznávají pouze biologicky významné L-formy metanefrinů. Komerčně dostupný syntetický normetanefrin nebo metanefrin je vždy směsí jejich D- a L-form. Poměr mezi oběma formami se šarží od šarže značně liší, což má závažné důsledky při obohacování nativních vzorků syntetickými metanefriny. Jelikož při použití této soupravy bude detekováno jen okolo 50 % syntetických metanefrinů, tj. podíl jejich L-formy, budou takovéto vzorky podhodnoceny. Z tohoto důvodu by měly být použity pouze nativní vzorky.

### **2. Návod k použití soupravy**

#### **2.1 Spolehlivost výsledků**

K zajištění spolehlivého vyhodnocení výsledků testu je nutné postupovat dle přiložených instrukcí a v souladu se běžnými pravidly a pokyny (GLP, RILIBÄK, atd.). Zvláštní pozornost musí být věnována kontrole preciznosti a správnosti během testu; výsledky těchto kontrol musí být v normálních mezích. V případě významných nesrovnalostí mezi předem stanovenými parametry testu a aktuálními výsledky kontaktujte výrobce soupravy, který vám sdělí další pokyny.

#### **2.2 Reklamacce**

V případě stížností předložte výrobci písemnou zprávu obsahující údaje o způsobu provedení zkoušky a získání jejích výsledků a kopii tištěného originálu protokolu zkoušky. Kontaktujte prosím výrobce, od kterého obdržíte reklamační formulář a kompletně vyplněný ho pošlete zpět výrobci.

#### **2.3 Záruka**

Tato testovací souprava byla vyrobena dle nejnovějších technologií a podrobena přísné interní a externí kontrole kvality. Jakékoli změny v testovací soupravě, metodě stanovení nebo použití reagensů z různých šarží může mít negativní vliv na výsledky, a proto se na tyto případy záruka nevztahuje. Výrobce není odpovědný za poškození během přepravy.

#### **2.4 Likvidace**

Zbytky substancí a/nebo všechny zbývající chemikálie, reagentie a roztoky připravené k použití jsou považovány za speciální odpad. Jejich likvidace je předmětem místních zákonů a nařízení. O likvidaci speciálního odpadu informujte příslušné orgány nebo firmy specializované na likvidaci odpadů. Likvidace soupravy musí být provedena podle místních

předpisů. Právním základem pro likvidaci speciálního odpadu je zákon o odpadech a systému recyklace.

Příslušné bezpečnostní listy jednotlivých výrobků jsou k dispozici na webových stránkách. Bezpečnostní listy odpovídají normě ISO 11014-1.

## 2.5 Interference

Nemíchejte reagenty a roztoky z různých šarží. Mějte na paměti jejich odlišné skladovací podmínky a přepravu. Nevhodné zacházení se vzorky nebo odchylky od pokynů v testu mohou ovlivnit jeho výsledky. Nepoužívejte žádné součásti soupravy po uplynutí doby expirace. Zamezte mikrobiálnímu znečištění reagentů a promývací vody. Dodržujte doby inkubace a instrukce k promývání.

## 2.6 Bezpečnostní opatření

Dodržujte délku inkubačních dob a instrukce k promývání. Nikdy nepipetujte ústy a zamezte kontaktu kůže s reagenty a vzorky. Nekuřte, nejezte a nepijte v prostorách, kde je manipulováno se vzorky nebo zkumavkami ze soupravy. Při práci se soupravou nebo se vzorky vždycky používejte ochranné rukavice a umyjte si řádně ruce ihned po ukončení práce. Zamezte jakémukoli rozstříkání. Zamezte kontaktu reagentů s pokožkou. Používejte ochranný oděv a jednorázové rukavice. Všechny kroky musí být provedeny dle návodu. Optimálních výsledků lze dosáhnout pouze s použitím kalibrovaných pipet. Azid sodný může reagovat s olověným nebo měděným potrubím za vzniku vysoce výbušných azidů kovových prvků. Pro zamezení jejich vzniku spláchněte odpad velkým množstvím vody. Souprava obsahuje  $^{125}\text{I}$  (poločas rozpadu: 60 dní), který emituje ionizující rtg záření (28 keV) a záření gama (35,5 keV).

Radioaktivní materiál může být přijímán, pořizován, držen a používán pouze lékaři, veterináři ve veterinární praxi, klinickými laboratořemi a nemocnicemi, a to pouze pro in-vitro klinické nebo laboratorní testy, které nezahrnují vnitřní nebo vnější podání materiálu nebo záření z něj vycházejícího lidem nebo zvířatům. Jeho přijetí, pořizování, držení, používání a přeprava podléhá předpisům a obecné licenci Komise pro dohled nad jadernou bezpečností USA (U.S. Nuclear Regulatory Commission) nebo státu, s nímž komise uzavřela dohodu o výkonu regulační pravomoci. Přípravek nesmí být v žádném případě podáván lidem ani zvířatům.

Veškerá manipulace s radioaktivním materiálem musí být prováděna v prostorách k tomu určených, stranou běžného provozu. Kniha zaznamenávající příjem a skladování radioaktivního materiálu musí být uložena v laboratoři. Laboratorní vybavení a sklo, které může být kontaminováno radioaktivními látkami, by mělo být odděleno, aby se předešlo zkřížené kontaminaci jinými radioizotopy.

Jakýkoli rozlitý radioaktivní materiál musí být okamžitě v souladu s bezpečnostními postupy. Radioaktivní odpad musí být zlikvidován podle místních předpisů a pokynů příslušných úřadů. Dodržování základních pravidel radiační bezpečnosti zaručuje dostatečnou ochranu.

Všechny reagenty soupravy obsahující lidské nebo zvířecí sérum nebo plasmu byly testovány na přítomnost HIVI/II, HbsAg a HCV metodami schválenými FDA a byly shledány jako negativní. I přesto musí být všechny reagenty při manipulaci a likvidaci pokládány za potenciálně rizikový biologický materiál.

## 3. Skladování a trvanlivost

Skladujte reagenty – **kromě Acylačního koncentrátu** – při 2-8 °C do data expirace. Acylační koncentrát by měl být skladován při pokojové teplotě. Nepoužívejte žádnou ze složek soupravy po uplynutí data expirace uvedeného na obalu. Při jednotlivých stanoveních nemíchejte součásti z různých souprav.

#### 4.1 Obsah soupravy

BA D-0023		Reagenční zkumavky	2 x 50 zkumavek	Připraveno k použití
BA R-0030		Precipitační činidlo	2 x 55 ml	Připraveno k použití, kozi anti-králičí sérum v PEG a fosfátovém pufru. <i>Před použitím důkladně promíchejte!</i>
BA R-0028		Vyrovňovací činidlo	2 x 10 ml	Připraveno k použití
BA R-0050		Tlumicí roztok	3 x 4 ml	Připraveno k použití
BA R-0120		<sup>125</sup> I-Adrenalin-Metanefrin	1 x 5,5 ml	Aktivita < 200 kBq, připraveno k použití, červené zbarvení, modré víčko
BA R-0220		<sup>125</sup> I-Noradrenalin-Normetanefrin	1 x 5,5 ml	Aktivita < 200 kBq, připraveno k použití, červené zbarvení, žluté víčko
BA R-7110		Adrenalin-Metanefrin antisérum	1 x 5,25 ml	Králičího původu, připraveno k použití, žluté zbarvení, modré víčko
BA R-8210		Normetanefrin antisérum	1 x 5,25 ml	Králičího původu, připraveno k použití, žluté zbarvení, žluté víčko
BA R-8301		Standard A	1 x 12 ml	Připraveno k použití
BA R-8302		Standard B	1 x 4 ml	Připraveno k použití
BA R-8303		Standard C	1 x 4 ml	Připraveno k použití
BA R-8304		Standard D	1 x 4 ml	Připraveno k použití
BA R-8305		Standard E	1 x 4 ml	Připraveno k použití
BA R-8306		Standard F	1 x 4 ml	Připraveno k použití
BA R-8312		Acylační koncentrát	1 x 1,5 ml	Koncentrovaný
BA R-8351		Kontrolní vzorek 1	1 x 4 ml	Připraveno k použití
BA R-8352		Kontrolní vzorek 2	1 x 4 ml	Připraveno k použití

#### 4.2 Další potřebný materiál a vybavení neobsažené v soupravě

- Kalibrované mikropipety s variabilním objemem (např. 10 - 100 µl / 100 – 1000 µl)
- Kónické zkumavky a odpovídající stojan,
- Vhodné zařízení pro odsávání nebo dekantování zkumavek
- Centrifuga s rychlostí alespoň 3000x g
- Pro alternativní postup s krátkou inkubační dobou - třpačka (amplituda 3 mm, přibližně 600 rpm)
- Gama-čítač, vibrační míchadlo (vortex), destilovaná voda

#### 5. Odběr vzorků a jejich skladování

Je nutné použít EDTA- nebo citrátovou plasmu. Hemolyzované a zvláště lipemické vzorky by neměly být analyzovány.

Skladování: do 6 hodin při 2-8 °C, pro delší období (max. 6 měsíců) při -20 °C

Je třeba zamezit opakovanému zmrazování a rozmrazování.

#### 6. Postup

Vytemperujte všechny reagensy – s výjimkou precipitačního činidla – na pokojovou teplotu a před použitím je řádně promíchejte opatrným převrácením dnem vzhůru. Očísľujte zkumavky. Je vhodné provádět stanovení v duplikátech.

*Pipetované tekutiny by neměly ulpívat na stěnách RIA zkumavek. V případě potřeby odstraňte ulpívající tekutinu odstředěním po dobu 1 minuty při 500xg.*

## 6.1 Příprava reagensů

### Vyrovnávací činidlo

Vyrovnávací činidlo musí být rekonstituováno 10 ml destilované vody. Rekonstituované vyrovnávací činidlo, které není ihned použito, musí být zmrazeno na -20 °C (po alikvotech) a může být rozmrazeno pouze jednou.

### Acylační roztok

Napipetujte 80 µl koncentrátu acylačního činidla do 3 ml destilované vody a řádně promíchejte. Okamžitě spotřebujte!

*Acylační roztok je stálý pouze po dobu 3 minut.*

## 6.2. Precipitace

1. Napipetujte **100 µl standardů, 100 µl kontrolních vzorků a 500 µl vzorků plasmy** do odpovídajících reagenčních zkumavek.
2. Přidejte **500 µl vyrovnávacího činidla** do všech zkumavek obsahujících **standardsy a kontrolní vzorky**.
3. Přidejte **100 µl Standardu A** do všech zkumavek obsahujících **vzorky plasmy**.
4. Promíchejte důkladně reagenční zkumavky (vortex) a odstřed'ujte **15 minut** při rychlosti **3000x g**. Odeberte **100 µl čirého supernatantu** pro RIA stanovení metanefrinu a **25 µl čirého supernatantu** pro RIA stanovení normetanefrinu.

## 6.3 RIA stanovení Metanefrinu

*Pro RIA stanovení se důrazně doporučuje použít kónické zkumavky!*

1. Napipetujte **100 µl destilované vody** do zkumavek určených na stanovení nespecifické vazby NSB (non-specific binding).
2. Napipetujte **100 µl čirých supernatantů standardů, kontrolních vzorků a vzorků** do odpovídajících zkumavek.
3. Napipetujte **50 µl tlumivého roztoku** do všech zkumavek (**mimo těch, které jsou určeny pro změření celkového počtu impulsů – „Total“**).
4. Napipetujte **25 µl acylačního roztoku** (viz bod 6.1) do všech zkumavek (**kromě zkumavek „Total“**).

*Acylační roztok je stálý pouze po dobu maximálně 3 minut.*

5. Důkladně promíchejte (vortex) a inkubujte po dobu **15 minut při pokojové teplotě** (20-25 °C).
6. Napipetujte **50 µl antiséra proti metanefrinu** do všech zkumavek (**kromě zkumavek „Total“ a NSB**), důkladně promíchejte (vortex).
7. Inkubujte po dobu **1 hodiny při pokojové teplotě** (20-25 °C).
8. Napipetujte **50 µl <sup>125</sup>I-metanefrinu** do všech zkumavek a důkladně promíchejte (vortex).
9. Uzavřete zkumavky. Inkubujte **15 – 20 hodin** (přes noc) při **2-8 °C**.

*Alternativně inkubujte 2 hodiny při pokojové teplotě (20-25 °C) na třepačce (přibližně 600 rpm).*

10. Důkladně promíchejte vychlazené (2-8 °C) **precipitační činidlo**, napipetujte **0,5 ml činidla** do každé zkumavky (**kromě zkumavek „Total“**) a promíchejte na vortexu.
11. Inkubujte **15 minut při 2-8 °C**.
12. Odstřed'ujte po dobu **15 minut** při **3000x g**, pokud možno ve chlazené centrifuzě.

### ***Přistupte bez prodlení ke kroku 13.***

13. **Opatrně slijte** nebo odsajte **supernatant** ze zkumavek (**kromě zkumavek „Total“**).  
Obraťte zkumavky dnem vzhůru, umístěte na savý papír a ponechejte je 2 minuty oschnout.
14. Proměřte zkumavky gama-čítačem po dobu **1 minuty**.

### **6.4 RIA stanovení Normetanefrinu**

*Pro RIA stanovení se důrazně doporučuje použít kónické zkumavky!*

1. Napipetujte **25 µl destilované vody** do zkumavek určených na stanovení nespecifické vazby **NSB** (non-specific binding).
2. Napipetujte **25 µl čirých supernatantů standardů, kontrolních vzorků a vzorků** do odpovídajících zkumavek.
3. Napipetujte **50 µl tlumivého roztoku** do všech zkumavek (**mimo těch, které jsou určeny pro změření celkového počtu impulsů – „Total“**).
4. Napipetujte **25 µl acylačního roztoku** (viz bod 6.1) do všech zkumavek (**kromě zkumavek „Total“**).

**Acylační roztok je stálý pouze po dobu maximálně 3 minut.**

5. Důkladně promíchejte (vortex) a inkubujte po dobu **15 minut při pokojové teplotě** (20-25 °C).
6. Napipetujte **50 µl antiséra proti normetanefrinu** do všech zkumavek (**kromě zkumavek „Total“ a NSB**), důkladně promíchejte (vortex).
7. Inkubujte po dobu **1 hodiny při pokojové teplotě** (20-25 °C).
8. Napipetujte **50 µl <sup>125</sup>I-normetanefrinu** do všech zkumavek a důkladně promíchejte (vortex).
9. Uzavřete zkumavky. Inkubujte **15 – 20 hodin** (přes noc) při **2-8 °C**.  
Alternativně inkubujte **2 hodiny** při **pokojové teplotě** (20-25 °C) na **třepačce** (přibližně 600 rpm).
10. Důkladně promíchejte vychlazené (2-8 °C) **precipitační činidlo**, napipetujte **0,5 ml činidla** do každé zkumavky (**kromě zkumavek „Total“**) a promíchejte na vortexu.
11. Inkubujte **15 minut** při **2-8 °C**.
12. Odstředějte po dobu **15 minut** při **3000x g**, pokud možno ve chlazené centrifuze.

### ***Přistupte bez prodlení ke kroku 13.***

13. **Opatrně slijte** nebo odsajte **supernatant** ze zkumavek (**kromě zkumavek „Total“**).  
Obraťte zkumavky dnem vzhůru, umístěte na savý papír a ponechejte je 2 minuty oschnout.
14. Proměřte zkumavky gama-čítačem po dobu **1 minuty**.

### **7. Výpočet výsledků**

Standard	Koncentrace standardů					
	A	B	C	D	E	F
Normetanefrin (pg/ml)	0	48	160	480	1600	4800
Normetanefrin (pmol/l)	0	262	874	2620	8740	26200
Metanefrin (pg/ml)	0	36	120	360	1200	3600
Metanefrin (pmol/l)	0	183	608	1830	6080	18300
<b>Přepočet:</b>	Normetanefrin (pg/ml) x 5.46 = Normetanefrin (pmol/l) Metanefrin (pg/ml) x 5.07 = Metanefrin (pmol/l)					

Odečtete průměrnou hodnotu cpm nespecifických vazeb NSB od průměrné hodnoty cpm standardů, kontrolních vzorků a vzorků.

Kalibrační křivka, ze které jsou odečítány koncentrace vzorků, je sestrojena vynesáním procenta (B-NSB)/(B0-NSB) změřeného pro standardy (lineární měřítko, osa y), proti

odpovídajícím koncentracím (logaritmické měřítko, osa x). Pro proložení křivky použijte nelineární regresi (např. spline, čtyřparametrovou funkci, akima).

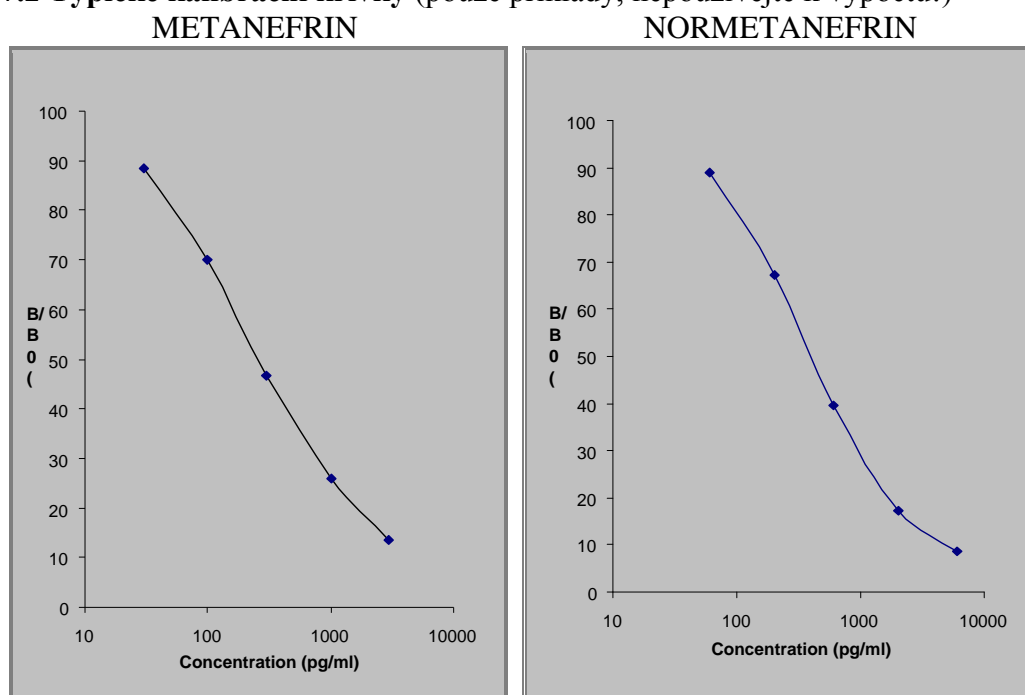
Koncentrace vzorků a kontrolních vzorků mohou být odečteny přímo z kalibrační křivky.

Vzorky s vyšší koncentrací než má nejvyšší standard (Standard F) by měly být zředěny vyrovnávacím činidlem (BA R-0028) a znovu analyzovány.

### 7.1 Kontrola kvality

Je doporučeno používat kontrolní vzorky dle příslušných místních norem. Jejich koncentrace by měla odpovídat normálním i patologickým hodnotám. Výsledky kontrolních vzorků (ze soupravy nebo jiné komerčně dostupné) by se měly nacházet uvnitř stanovených přípustných limitů. Přípustné limity kontrolních vzorků ze soupravy jsou uvedeny na protokolu kontroly kvality.

### 7.2 Typické kalibrační křivky (pouze příklady, nepoužívejte k výpočtu!)



### 8. Charakteristiky metody

<b>Očekávané referenční hodnoty</b>		Metanefrin	Normetanefrin
	Plasma	< 90 pg/mL	< 180 pg/mL

<b>Analytická citlivost (limit detekce)</b>		Metanefrin	Normetanefrin
	Plasma	19 pg/ml	24 pg/ml

<b>Analytická specifita (zkřížená)</b>	<b>Substance</b>	<b>Zkřížená reakce (%)</b>	
		Metanefrin	Normetanefrin
	Derivatizovaný	100	0,08

<b>reakce)</b>	metanefrin		
	Derivatizovaný normetanefrin	0,04	100
	3-methoxytyramin.HCl	< 0,001	1,74
	Adrenalin	< 0,001	< 0,001
	Noradrenalin	< 0,001	< 0,001
	Dopamin.HCl	< 0,001	< 0,001
	Kyselina vanilmandlová	< 0,001	< 0,001
	Kyselina homovanilinová	< 0,001	< 0,001
	L-DOPA	< 0,001	< 0,001
	L-tyrosin	< 0,001	< 0,001
	Tyramin.HCl	< 0,001	< 0,001
	Normetanefrin	< 0,001	< 0,001
	Acetaminofen	< 0,001	< 0,001




<b>Preciznost</b>							
<b>V sérii</b>				<b>Mezi sériemi</b>			
	Vzorek	Rozsah (pg/ml)	CV (%)		Vzorek	Rozsah (pg/ml)	CV (%)
Metanefrin	1	185 ± 18	9,8	Metanefrin	1	217 ± 30	14
	2	372 ± 32	8,7		2	388 ± 47	12
	3	891 ± 131	15		3	781 ± 87	11
Normetanefrin	1	234 ± 24	10	Normetanefrin	1	240 ± 20	8,3
	2	488 ± 43	8,7		2	518 ± 29	5,6
	3	1180 ± 93	7,9		3	1144 ± 71	6,2

<b>Linearita</b>			Rozsah (pg/ml)	Sériové ředění do:	Průměr (%)
	Metanefrin	Plasma	25-2100	1:65	91
	Normetanefrin	Plasma	40-6000	1:129	100

<b>Výtěžnost</b>			Průměr (%)	Rozsah (%)	% Výtěžnost po obohacení
	Metanefrin	Plasma	103	85-122	
	Normetanefrin	Plasma	107	95-119	

Srovnání metody s LC-MS/MS	Metanefrin	Plasma	LC-MS/MS = x - 13,2	R=0,99; n=50
	Normetanefrin	Plasma	LC-MS/MS = 1,2x - 29,6	R=0,99; n=50

Pro aktuální literaturu, klinické informace nebo jakékoli další informace kontaktujte svého dodavatele.

	Teplota skladování		Výrobce		Obsahuje materiál dostačující
---	--------------------	---	---------	---	-------------------------------



					pro <n> analýz
	Datum exspirace		Číslo šarže		In-vitro diagnostický přípravek
	Přečtěte si návod k použití		Obsah		Označeno značkou shody
	Pozor!	<b>REF</b>	Katalogové číslo		Pouze pro výzkumné účely