НАБІР РЕАГЕНТІВ

МІКРОАЛЬБУМІН ELISA

Microalbumin ELISA

Каталог. №: ***EIA-3881*** *Дата випуску інструкції:* ***12-09-2011***
Версія: ***3.1***

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

НАЗВА І ПРИЗНАЧЕННЯ

Мікроальбумін - це конкурентний імуноферментний твердофазний аналіз (ІФА) для кількісного вимірювання альбуміну людини в сечі. Аналіз призначений лише для діагностики in vitro як допоміжний засіб для діагностики мікроальбумінурії.

КОРОТКИЙ ОПИС ТА ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ

Білки, що проходять через клубочкову базальну мембрану нирки, проходять диференційоване фільтрування. Проникність обернено пропорційна молекулярній масі (альбумін близько 0,6%, міоглобулін близько 75%). Проте в сечі можна виявити лише мінімальну кількість білка, оскільки велика кількість білка реабсорбується трубочками. Підвищену проникність клубочкового білка та високу елімінацію канальцевого білка з плазми можна диференціювати, вимірюючи розподіл молекулярної маси вилучених білків.

Структура елімінованих білків із сечею дає інформацію про:

- підвищену елімінацію білка
- попередню діагностику дефекту нирки
- диференціація протеїнурії
- клубочкова або канальцева протеїнурія

Діагностично відповідні білки:

- IgG (150 кД)
- Альфа-1-мікроглобулін (33 кД)
- Бета-2-мікроглобулін (12 кД)
- Альбумін (66 кД)
- білок, що зв'язує ретинол (21 кД)
- Імуноглобулінові легкі ланцюги (білок Бенс-Джонса) (22 кД)

Альбумін має відносну молекулярну масу 66 кД. Він міститься в сечі в дуже низьких концентраціях.

У разі дуже активного процесу клубочкової фільтрації секреція альбуміну може виникати без основного захворювання нирок. Така ситуація називається «мікроальбумінурія». Виявлення цих малих кількостей секреції (від 30 до 150 мкг / хв або мл) вимагає дуже чутливих тест-систем [1,6], напр. імунологічних методів. Фізичний стрес також може спричинити підвищену секрецію альбуміну без захворювання нирок.

При діабеті секреція альбуміну є дуже важливим параметром для оцінки функції нирок. Значення сечі, що перевищують 25 мкг/мл, свідчать про шкідливу функцію нирок у хворих на цукровий діабет, залежних від інсуліну [2,3] (тип I) та інсулінонезалежних [4,5,6] (тип II). Тому визначення альбуміну є важливим діагностичним інструментом при діабетичних нефропатіях [1, 7, 8].

Показання: Мікроальбумінурія

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Високоочищений альбумін людини зв'язується з мікролунками. Калібратори, контролі та нерозбавлені зразки пацієнтів піпетують у лунки разом із кон'югатом пероксидази проти людського альбуміну. Мікроальбумін, якщо він присутній у розведеній сечі, буде конкурувати з покритим альбуміном, за зв'язування кон'югату проти альбуміну. Промивання мікролунок видаляє неспецифічні компоненти. Ферментний субстрат у присутності зв'язаного кон'югату гідролізується, утворюючи синій колір. Додавання кислоти зупиняє реакцію, утворюючи кінцевий продукт жовтого кольору. Інтенсивність цього жовтого кольору вимірюється фотометрично при 450 нм. Кількість забарвлення обернено пропорційна концентрації альбуміну, присутнього у вихідному зразку.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Всі реагенти цього набору призначені виключно для діагностики in vitro.
2. Не замінюйте компоненти набору з різних партій.
3. Компоненти, що містять сироватку людини, були протестовані та визнані негативними щодо HBsAg та ВІЛ, методами, затвердженими FDA. Жоден тест не може гарантувати відсутність HBsAg або ВІЛ, тому всі реагенти на основі людської сироватки в цьому наборі повинні оброблятися так, ніби здатні передавати інфекцію.
4. Уникайте контакту з ТМВ (3,3´, 5,5´-тетраметил-бензидин). Якщо ТМБ потрапляє на шкіру, ретельно промити водою з милом.
5. Уникайте контакту з Стоп-розчином, який є кислотним. У разі потрапляння на шкіру ретельно промити водою та звернутися до лікаря.
6. Деякі компоненти набору (наприклад, Контролі, буфер для зразків та буферизований розчин для промивання) містять азид натрію в якості консерванту. Азид натрію (NaN_3) є високотоксичним і реагує в чистому вигляді. У концентраціях продукту, хоча і не небезпечний. Незважаючи на класифікацію як небезпечну, ми настійно рекомендуємо дотримуватися лабораторної практики (див. 8., 9., 10.)
7. Деякі компоненти набору містять Proclin 300 в якості консерванту. Під час утилізації реагентів, що містять Proclin 300, промийте каналізацію великою кількістю води для розведення компонентів нижче активних рівнів.
8. Одягати одноразові рукавички під час роботи зі зразками або реактивами з набору, а після цього ретельно вимити руки.
9. Не піпетувати ротом.
10. Не їжте, не пийте, не куріть і не наносьте макіяж у місцях, де працюють із зразками або реактивами з набору.
11. Уникайте контакту між забуференим розчином перекису та легко окислювальними матеріалами; Екстремальна температура може спричинити самозаймання.

Дотримуйтесь вказівок щодо проведення контролю якості в медичних лабораторіях, аналізуючи контролі та / або об'єднані сироватки. Під час роботи з усіма реагентами, контролями та зразками сироватки дотримуйтесь існуючих законодавчих норм.

ВМІСТ НАБОРУ

Розмір упаковки	96 визначень
К-сть 1	Роздільний **мікропланшет**, що складається з 12 модулів по 8 лунок, покритих високоочищеним людським альбуміном. Готовий до використання.
6 флаконів, по 0,5 мл кожен	**Стандарт** мікроальбуміну (A-F) у матриці PBS / BSA (NaN_3 <0.1% (мас./мас.)), що містить мікроальбумін: 0.15; 1.5; 6; 25; 100 та 400 мкг / мл. Готовий до використання.
2 флакони, по 0,5 мл кожен	**Контролі** мікроальбуміну в матриці PBS / BSA (NaN_3 <0.1% (мас. / мас.)) позитивні (1) та негативні (2), для відповідних концентрацій див. інструкцію-вкладиш. Готовий до використання
1 флакон, 10 мл	**Буфер для зразків** (Tpic, NaN_3 <0.1% (мас./мас.)), Жовтий. Готовий до використання.
1 флакон, 15 мл	Розчин **ферментного кон'югату** (PBS, Proclin 300 <0.5% (об. об.)), (Світло-червоний), що містить поліклональний анти-людський альбумін; мічена пероксидазою хрону. Готовий до використання
1 флакон, 15 мл	**Розчин ТМБ субстрату.** Готовий до використання.
1 флакон, 15 мл	**Стоп-розчин** (містить кислоту). Готовий до використання.
1 флакон, 20 мл	**Промивний розчин** (PBS, NaN_3 <0,1% (мас./мас.)), концентрат (50х).

ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

1. Зберігайте набір при 2-8 °C.
2. Зберігайте лунки мікропланшетів закритими в сухому мішечку з осушувачем.
3. Реагенти стабільні до закінчення терміну дії набору.
4. Не піддавати тест-реагенти впливу тепла, сонця або сильного світла під час зберігання та використання.
5. Розведений промивний буфер стабільний щонайменше 30 днів за умови зберігання при температурі 2-8 ° C.

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

Обладнання:

- Зчитувач мікропланшетів, здатний вимірювати кінцеві точки при 450 нм
- Багатоканальний дозатор або повторювана піпетка на 100 мкл
- Вортексний змішувач
- Піпетки по 10 мкл, 100 мкл і 1000 мкл
- Лабораторний таймер
- Програмне забезпечення для зменшення даних

Приготування реагентів
- дистильована або деіонізована вода
- градуйований циліндр на 100 і 1000 мл
- пластиковий контейнер для зберігання промивного розчину

ЗАБІР, ЗБЕРІГАННЯ ТА ОБРОБКА ЗРАЗКІВ
- Зберіть ранкову сечу.
- Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 ° C протягом п'яти днів або зберігати при -20 ° C до шести місяців.
- Уникайте повторного заморожування та розморожування зразків сечі. Це може призвести до змінної втрати активності альбуміну.
- Зразки сечі не потрібно розбавляти. Якщо очікуються вищі концентрації, зразки слід розбавляти буфером для зразків та розглядати розведення під час розрахунку.

ПРОЦЕДУРНІ ПРИММІТКИ
1. Не використовуйте компоненти набору після закінчення терміну придатності.
2. Не замінюйте компоненти набору з різних партій.
3. Всі матеріали повинні бути кімнатної температури (20-28 ° C).
4. Підготуйте всі реагенти та зразки перед початком аналізу. Після початку, тестування слід проводити без перерв, щоб отримати найбільш надійні та послідовні результати.
5. Виконуйте етапи аналізу лише у вказаному порядку.
6. Завжди використовуйте свіжі розведення зразків.
7. Піпеткою перенесіть усі реагенти та зразки на дно лунок.
8. Щоб уникнути забруднення при перенесенні, змініть наконечник між зразками та різними контролями набору.
9. Для досягнення найкращих результатів важливо ретельно вимити мікролунки та видалити останні краплі буфера для промивання.
10. Всі етапи інкубації повинні бути точно визначені.
11. Контрольні сироватки або пули слід регулярно аналізувати як невідомі, щоб перевірити ефективність реагентів та аналіз.
12. Не використовуйте лунки мікропланшетів повторно.

Для всіх контролів на етикетках кожного флакона вказані відповідні концентрації. Використовуючи ці концентрації, можна розрахувати калібрувальну криву для зчитування напівкількісних результатів пацієнта.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ
Приготування промивного розчину
Перед використанням розведіть вміст кожного флакона концентрату буферного розчину для промивання (50x) дистильованою або деіонізованою водою до кінцевого об'єму 1000 мл.
Зберігати в холодильнику: стабільний при температурі 2-8 ° C принаймні 30 днів після приготування або до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ
1. Підготуйте достатню кількість модулів мікропланшетів для розміщення калібраторів, контролів та зразків пацієнтів у двох примірниках.
2. Додайте в лунки по 20 мкл калібраторів, контролів та нерозведених зразків пацієнтів.
3. Додайте 100 мкл розчину ферментного кон'югату в кожну лунку.
4. Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (20 - 28 ° C).
5. Утилізуйте вміст мікролунок і промийте 3 рази з 300 мкл промивного розчину.
6. Внесіть 100 мкл розчину субстрату ТМБ у кожну лунку.
7. Інкубуйте протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.
8. Додайте 100 мкл Стоп-розчину в кожну лунку модулів, залишивши постояти протягом 5 хвилин.
9. Зчитайте оптичну щільність при 450 нм і обчисліть результати. Рекомендується двохроматичне вимірювання з еталоном при 600 - 690 нм.
   Утворений колір стійкий щонайменше 30 хвилин. Зчитайте оптичну щільність протягом цього часу.

Автоматизація
Набір ІФА Мікроальбумін підходить для використання на відкритих автоматизованих процесорах ELISA. Детально описана вище процедура тестування підходить для використання з автоматизацією або без неї.

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ
Контроль якості
Цей тест є дійсним лише в тому випадку, якщо оптична щільність при 450 нм для позитивного контролю (1) та негативного контролю (2), а також для калібраторів A і F відповідає певному діапазону, зазначеному в сертифікаті контролю якості, що додається до кожного тестового набору! Якщо якийсь із цих критеріїв не виконується, результати є недійсними, і тест слід повторити.

Розрахунок результатів
Для тесту Мікроальбумін рекомендується 4-Parameter-Fit з lin-log-координатами для оптичної щільності та концентрації.

Зменшення даних вручну: рекомендований графік Lin-Log
Спочатку розрахуйте середню оптичну щільність для кожної лунки калібратора. Використовуйте графічний папір Lin-log і побудуйте графік середньої оптичної щільності кожного калібратора до його концентрації. Намалюйте найкращу криву, що підходить, апроксимуючи шлях усіх точок калібратора. Точки калібратора також можуть бути з'єднані відрізками прямої лінії. Потім концентрацію невідомих можна оцінити на калібрувальній кривій шляхом інтерполяції. Слід враховувати розведення зразків сечі.

Приклад розрахунку
На малюнках нижче наведені типові результати для Мікроальбуміну ІФА. Ці дані призначені лише для ілюстрації і не повинні використовуватися для обчислення результатів іншого запуску.

Калібратори									
№:	Позиція	ОЩ1	ОЩ2	Серед.	Конц.1	Конц.2	Серед.	Відх. конц.	КВ%
STA	A1/B1	2.148	2.156	2.152	0.1	0.1	0.1	0.0	0
STB	C1/D1	1.748	1.746	1.747	1.5	1.5	1.5	1.5	0
STC	E1/F1	1.221	1.244	1.233	6.4	6.1	6.2	6.0	1
STD	G1/H1	0.700	0.687	0.694	23	24	24	25	1
STE	A2/B2	0.264	0.280	0.272	111	102	107	100	4
STF	C2/D2	0.098	0.091	0.094	368	396	382	400	5

Інтерпретація результатів
У дослідженні нормального діапазону із зразками сечі здорових донорів було встановлено наступний діапазон за допомогою тесту Мікроальбумін:

зразки сечі: 0 - 25 мкг/мл Альбумін

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала свої власні нормальні та патологічні діапазони рівнів сечі.

РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
Паралельність
В експериментах з розведенням зразки сечі з високими концентраціями альбуміну розбавляли буфером для зразків і аналізували в наборі Мікроальбумін. Аналіз показав лінійність у всьому діапазоні вимірювань.

Точність (відтворюваність)
Статистичні дані були розраховані для кожного з трьох зразків за результатами 24 визначень за один пробіг для точності Внутрішнього аналізу. Точність побіжного пробігу була розрахована за результатами 5 різних прогонів з 6 визначеннями в кожному:

	1	2	3	4	5	6
A	SA	SE	P1	P5		
B	SA	SE	P1	P5		
C	SB	SF	P2	P..		
D	SB	SF	P2	P..		
E	SC	C1	P3			
F	SC	C1	P3			
G	SD	C2	P4			
H	SD	C2	P4			

SA-SF: стандарти від A до F P1, P2 ...: зразок пацієнта 1, 2 ...
C1: позитивний контроль
C2: негативний контроль

В аналізі		
Зразок №:	Середнє Мкг/мл	КВ (%)
1	25.2	5.3
2	50.9	3.3
3	80.2	3.6

Між аналізами		
Зразок №:	Середнє Мкг/мл	КВ (%)
1	24.8	4.2
2	50.1	5.1
3	78.6	2.9

Чутливість
Нижня межа виявлення Мікроальбуміну була визначена на рівні 0.5 мкг/мл.

Специфічність
Антисироватка (поліклональна), мічена пероксидазою хрону, є високоспецифічною для альбуміну людини.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ
Мікроальбумін ІФА є діагностичним допоміжним засобом. Точний клінічний діагноз не повинен базуватися на результатах одного тесту, а повинен встановлюватися лікарем після того, як будуть оцінені всі клінічні та лабораторні результати.

ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drg@drg-diagnostics.de

УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua