

Микроальбумин (Micro-Albumin)

Иммуноферментный набор для количественного определения альбумина в моче 96 тестов

Инструкция пользователя

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ORGENTEC Micro-Albumin предназначен для количественного определения человеческого альбумина конкурентным иммуноферментным методом. Этот метод предназначен только для диагностики *in vitro* микроальбуминурии.

Скорость экскреции альбумина с мочой является важным средством контроля и профилактическим параметром функции почек. Если процесс клубочковой фильтрации очень активен, экскреция альбумина может быть повышена без какого-либо повреждения почки. Физический стресс также может вызвать микроальбуминурию.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В лунках микропланшета сорбирован высокоочищенный человеческий альбумин.

Определение основано на методе конкурентного иммуноферментного анализа со следующими этапами:

Калибраторы, контроли и образцы мочи инкубируют вместе с конъюгатом антиальбумин-пероксидаза в лунках. Альбумин, если он присутствует, будет конкурировать с покрытым альбумином за связывание анти-альбумин-конъюгата. Промывкой удаляют неспецифические компоненты из лунок. Связанный ферментный конъюгат будет гидролизовать ферментный субстрат ТМБ. Добавление кислоты останавливает реакцию, образуя конечный продукт желтого цвета. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при 450 нм. Она обратно пропорционально концентрации альбумина, присутствующего в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены только для диагностики *in vitro*, только для профессионального использования.

2. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфекционно-опасными.

3. Бычий сывороточный альбумин (БСА), входящий в состав компонентов набора, был протестирован на наличие губчатого энцефалита крупного рогатого скота. Результаты были отрицательными.

4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином).

5. Стоп-раствор содержит кислоту. Реагент не является опасным, тем не менее, избегайте контакта реагента с кожей и слизистыми оболочками.

6. Контроли, буфер для образцов, буфер для промывок содержат азид натрия 0,09% в качестве консерванта. В концентрации, содержащейся в поставляемых реагентах, не является опасным.

7. Ферментный конъюгат содержит Проклин 300 0.05% в качестве консерванта. При этой концентрации реагент не является опасным.

8. При работе со всеми реагентами, контролями и образцами сывороток соблюдайте указания в руководствах по безопасности и т.н. «надлежащей лабораторной практике».

9. Оказание первой помощи: в случае контакта с кожей, тщательно промойте с водой и мылом. Снимите загрязненную одежду и обувь, тщательно ее промойте. В случае контакта системных жидкостей с кожей, промойте большим количеством воды. В случае попадания реагентов в глаза, промойте под проточной водой в течение как минимум 10 минут. При необходимости обратитесь за медицинской помощью.

10. Персональная безопасность, средства защиты и экстренные меры: см. руководства по мерам безопасности при работе в лаборатории. Избегайте контакта реагентов с кожей и глазами. Не глотайте реагенты. Не пипетируйте ртом. Не ешьте, не пейте, не курите, не делайте макияж в помещении, где проводится анализ. При пролипании реагента, соберите его с использованием инертных материалов и поместите в подходящий контейнер для отходов.

11. Предотвращение контакта/персональная защита: используйте резиновые или латексные защитные перчатки. Используйте защитные очки. При использовании компонентов набора по назначению, они не представляют опасности.

12. Необходимо избегать: раствор субстрата является светочувствительным. Храните реагент в темноте.

13. При утилизации лабораторных отходов соблюдайте национальные или региональные рекомендации.

14. Следуйте указаниям в руководствах по проведению контроля качества в медицинских лабораториях, используйте в постановках контрольные сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

ORG 5MA Достаточно для 96 определений

MICRO PLATE	1	Микропланшет, состоящий из 12 разделяемых стрипов по 8 лунок каждый. Готов к использованию. Маркировка на микропланшете: ALB
CALIB RATOR A	1x 1.5 мл	Калибратор А 0.15 мкг/мл, содержит альбумин в сывороточно - буферном матриксе (ФСБ, БСА, детергент, NaN ₃ 0.09%), желтый. Готов к использованию.

CALIB RATOR B	1x 1.5 мл	Калибратор В 1.5 мкг/мл, содержит альбумин в сывороточно - буферном матриксе (ФСБ, БСА, детергент, NaN ₃ 0.09%), желтый. Готов к использованию.
CALIB RATOR C	1x 1.5 мл	Калибратор С 6 мкг/мл, содержит альбумин в сывороточно - буферном матриксе (ФСБ, БСА, детергент, NaN ₃ 0.09%), желтый. Готов к использованию.
CALIB RATOR D	1x 1.5 мл	Калибратор D 25 мкг/мл, содержит альбумин в сывороточно - буферном матриксе (ФСБ, БСА, детергент, NaN ₃ 0.09%), желтый. Готов к использованию.
CALIB RATOR E	1x 1.5 мл	Калибратор E 100 мкг/мл, содержит альбумин в сывороточно - буферном матриксе (ФСБ, БСА, детергент, NaN ₃ 0.09%), желтый. Готов к использованию.
CALIB RATOR F	1x 1.5 мл	Калибратор F 400 мкг/мл, содержит альбумин в сывороточно - буферном матриксе (ФСБ, БСА, детергент, NaN ₃ 0.09%), желтый. Готов к использованию.
CONTR OL +	1x 1.5 мл	Положительный контроль, содержит альбумин в сывороточно - буферном матриксе (ФСБ, БСА, детергент, NaN ₃ 0.09%), желтый. Готов к использованию. Концентрация указана в сертификате анализа.
CONTR OL -	1x 1.5 мл	Отрицательный контроль, содержит альбумин в сывороточно - буферном матриксе (ФСБ, БСА, детергент, NaN ₃ 0.09%), желтый. Готов к использованию. Концентрация указана в сертификате анализа.
DILUE NT	20 мл	Буфер для разведения образцов РА, содержит ФСБ, детергент, консервант азид натрия 0.09%, желтый, готов для использования.
CONJU GATE G	15 мл	Ферментный конъюгат; содержит антитела к человеческому альбумину, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP); ФСБ, БСА, детергент, консервант Проклин 0.05%; красный раствор. Готов к использованию.
CONJU GATE M	15 мл	Ферментный конъюгат; содержит антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP); ФСБ, БСА, детергент, консервант Проклин 0.05%; красный раствор. Готов к использованию.
TMB	15 мл	Субстрат ТМВ; содержит 3,3', 5,5' - тетраметилбензидин, бесцветный. Готов к использованию.
STOP	15 мл	Стоп-раствор, содержит кислоту. Готов к использованию.

WASH	20 мл	Промывочный буфер, содержит Трис, детергент, консервант азид натрия, концентрат 50x
	1	Сертификат анализа

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

1. Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм, оптимальный фильтр сравнения 620 нм.
2. Программное обеспечения для расчета результатов
3. Многоканальные пипетки или диспенсер на 100 мкл
4. Вортекс
5. Пипетки на 20, 100 и 1000 мкл
6. Лабораторный таймер
7. Дистиллированная или деионизированная вода
8. Мерные цилиндры на 1000 и 100 мл
9. Пластиковый контейнер для хранения промывающего раствора

ИФА наборы, производимые ORGENTEC можно использовать для работы на открытых автоматизированных ИФА анализаторах. Каждый метод необходимо валидировать на соответствующей автоматической системе. Более подробная информация предоставляется по запросу.

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данном анализе используется утренняя порция мочи. Образцы могут храниться охлажденными при 2 - 8°C до 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить при -20°C. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов мочи.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С в темноте
 2. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
 3. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
 4. Срок годности неоткрытого набора составляет 18 месяцев после даты производства. Реагенты стабильны течение всего срока годности (см. этикетки флаконов).
 5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C в течение 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.
- Рекомендовано реагенты готовить непосредственно перед использованием.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. Подготовьте все реагенты и образцы. После начала проводите анализ без каких-либо остановок между этапами.
5. Можно выполнять анализ в дублях. В этом случае могут быть отчетливо выявлены ошибки пипетирования. 6.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность этапов анализа, приведенную в данной инструкции.

7. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов.
8. Вносите все реагенты и образцы на дно лунок.
9. Для исключения контаминации меняйте наконечники при внесении каждого нового образца и разных контролей.
10. Тщательно промывайте лунки микропланшета. После промывки тщательно удалите остатки буфера из лунок.
11. Точно соблюдайте время всех инкубаций.
12. Не используйте повторно лунки микропланшета.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Промывочный раствор: Перед использованием разведите содержимое одного флакона с концентратом промывочного раствора, (50x) дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл.

Буфер для разведения образцов РА готов для использования.

Подготовка образцов: используйте неразбавленные образцы мочи. Если ожидаются очень высокие концентрации, образцы мочи следует разбавлять Буфером для разведения образцов РА и учитывать разведение при расчете. Примечание: калибраторы / контроли готовы к использованию и не нуждаются в разведении.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для тестирования контролей и тестируемых образцов в дублях.

1. Внесите в соответствующие лунки по **20 мкл** калибраторов, контролей и тестируемых образцов пациентов.

Внесите во все лунки по **100 мкл** раствора ферментного конъюгата.

Инкубируйте **30 минут** при комнатной температуре (20-28 °C).

Удалите содержимое лунок и **трижды промойте 300 мкл** промывочного раствора.

2. Внесите во все лунки по **100 мкл** субстрата ТМБ. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.

3. Внесите во все лунки по **100 мкл** стоп-раствора и инкубируйте **5 минут** при комнатной температуре. Считайте оптическую плотность при 450 нм (референс-фильтр 600-690 нм) и рассчитайте результаты. Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считывайте оптическую плотность за это время.

Пример схемы пипетирования

	1	2	3	4	5	6
a	A	P1				
b	B	P2				
c	C	P3				
d	D					
e	E					
f	F					
g	C+					
h	C-					

P1 – тестируемые образцы; A-F калибраторы; C+, C- контроли

ВАЛИДАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного теста считаются действительными только в случае, если значения ОП при 450 нм для калибраторов/контролей, а также контрольных материалов находятся в диапазонах, указанных в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и анализ должен быть повторен.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественной оценки результатов строят калибровочную кривую: на графике против оптической плотности для каждого калибратора отмечают концентрацию калибратора. Концентрация аналита в анализируемых образцах может быть оценена по калибровочной кривой путём интерполяции.

Можно использовать программное обеспечение для 4-х параметрической lin-log аппроксимации оптической плотности и определения концентрации аналита.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Измеряемый диапазон

Измеряемый диапазон данного ИФА метода: 1.5 – 400 мкг/мл
1.5 – 400 мкг/мл.

Норма: 0 - 25 мкг/мл

Повышенные значения : ≥ 25 мкг/мл

Линейность

Для определения динамического диапазона и верхнего/нижнего предела линейности образцы пациентов, содержащие альбумин в высоких концентрациях, были серийно разведены буфером для разведения образцов. Содержание антител в каждом разведении было определено по калибровочной кривой с использованием 4 – параметрической аппроксимации в lin-log координатах.

среднее	разведение	Наблюдаемое, мкг, мкг/мл	Ожидаемое, мкг, мкг/мл	Наб/ожд %
1	1:1	368.0	368.0	100
-	1:2	186.0	184.0	101
-	1:4	90.8	92.0	99
-	1:8	45.2	46.0	98
-	1:16	22.1	23.0	96
2	1:1	280.0	280.0	100
-	1:2	143.4	140.0	102
-	1:4	71.9	70.0	103
-	1:8	33.8	35.0	97
-	1:16	17.7	17.5	101

Предел определения (чувствительность)

Функциональная чувствительность была определена как 0.5 мкг/мл.

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость

между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Внутри серии			Между сериями		
Образец No	Значение x [µг/мл]	CV [%]	Образец No	Значение x [µг/мл]	CV [%]
1	25.2	5.3	1	24.8	7.2
2	50.9	3.3	2	50.1	5.1
3	80.2	3.6	3	78.6	2.9

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не наблюдалось интерференции при анализе образцов данным методом.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Этот анализ является диагностическим средством. Определенный клинический диагноз не должен основываться на результатах только одного теста, но должен быть поставлен врачом после того, как все клинические и лабораторные данные были оценены в совокупности с клинической картиной пациента. Также каждое решение о терапии должно приниматься индивидуально. Вышеуказанные патологические и нормальные референс-диапазоны для антител в образцах пациентов следует рассматривать только как рекомендацию. Каждая лаборатория должна установить свои собственные диапазоны в соответствии с требованиями ISO 15189 или другими применяемыми лабораторными руководствами.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

Микроальбумин

Добавить
20 мкл стандартов в
микроячейки

Контроли
20 мкл контролей или
неразбавленных проб пациента

Добавить **100 мкл** раствора ферментного коньюгата

Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре

Удалить содержимое ячеек и трижды промыть 300 µл промывочного раствора

Добавить **100 мкл** раствора субстрата ТМБ

Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре

Добавить **100 мкл** стоп-раствора

Выдержать **5 минут**

Считать при 450 нм