



Microalbumin ELISA (EIA-3881)

## Набор ИФА для определения концентрации альбумина в моче

Кат. № : EIA-3881  
Количество : 96  
Производитель : DRG (Германия)

Методика от 04/2008

Версия 2.0

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор является конкурентным твердофазным иммуноферментным анализом для количественного определения концентрации человеческого альбумина в моче. Предназначен исключительно для диагностики in-vitro, а также является вспомогательным средством при диагностике микроальбуминурии.

### ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

Белки, проходящие через гломерулярную базальную мембрану почки, подвергаются дифференцированному фильтрованию. Проницаемость обратно пропорциональна к молекулярному весу (Альбумин приблизительно 0.6 %, Миоглобулин приблизительно 75 %). Однако, только минимальные количества протеина могут быть обнаружены в моче, потому что большие количества протеина реабсорбируется канальцами. Повышенная гломерулярная проницаемость Альбумина(протеина) и высокое значение выведения белка плазмы в канальцах могут быть дифференцированы измерением распределения молекулярного веса выведенных белков.

Рисунок выведенных белков в моче дает информацию о:

- повышенное выведение белка
- дифференцирование протеинурии
- предиагноз почечного дефекта
- гломерулярная или тубулярная протеинурия

Диагностически значимые белки:

- IgG (мол. вес 150 000)
- Альбумин (мол. вес 66 000)
- $\alpha$ -1-Микроглобулин (мол. вес 33 000)
- Белок, связывающий Ретинол (мол. вес 21 000)
- $\beta$ -2-Микроглобулин (мол. вес 12 000)
- Легкие цепи иммуноглобулина (протеин Бенс-Джонса) (мол. вес 22 000)

Альбумин имеет относительную молекулярную массу 66 000 Да. Он содержится в моче в очень низких концентрациях. В случае очень активной клубочковой фильтрации секреция Альбумина может возникнуть вне зависимости от заболевания почек. Эту ситуацию называют "Микроальбуминурией". Обнаружение этой секреции (30 - 150 мкг/мин или мл) требует очень чувствительной тест-системы, то есть иммунологических методик. Также, физическое напряжение может вызвать повышенную секрецию Альбумина без проявления почечной болезни. При Диабете, секреция Альбумина - очень важный параметр для оценки почечной функции. Значения мочи выше, чем 25 мкг/мл, указывают губительное функционирование почек у пациентов с инсулинзависимым (тип 1) и инсулиннезависимым (тип 2) диабетом. Определение Альбумина является важным диагностическим инструментом при диабетических нефропатиях.

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Высокоочищенный человеческий альбумин привит к микролункам. Калибраторы, контроли и неразбавленные образцы пациента пипетируются в лунки вместе с конъюгатом анти-человеческой-альбумин-пероксидазы. Если микроальбумин присутствует в разбавленной моче, он станет конкурировать с альбумином на лунках за связывание анти-альбумин-конъюгата. Лунки промываются, чтоб удалить несвязанный материал. Ферментный субстрат в присутствии связанного конъюгата гидролизуется и формирует голубой окрас. Реакция останавливается добавлением кислоты, в результате чего формируется конечный продукт желтого цвета. Интенсивность этого желтого цвета измеряется фотометрически при 450 нм. Количество цвета обратно пропорционально концентрации альбумина, присутствующего в оригинальном образце.

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Все реагенты этого набора строго предназначены только для использования in vitro.
2. Не используйте в одном анализе компоненты наборов из разных лотов.
3. Набор содержит компоненты человеческого происхождения, проверенные методами FDA, которые были отрицательными по поверхностному антигену гепатита В и по ВИЧ антителам. Никакое из известных испытаний не может гарантировать, однако, что продукты, полученные из человеческой крови, не будут заразны. Поэтому все реагенты и человеческие производные крови, такие как плазменные или образцы сыворотки, должны быть расценены как способные к передаче инфекции.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Если ТМБ контактировал с кожей, тщательно промойте с водой и мылом.
5. Избегайте контакта со стоп-раствором. Стоп-раствор содержит соляную кислоту. Если он контактировал с кожей, тщательно промойте водой, а также обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (напр., контроли, буфер образца и забуференный промывочный раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ) в чистом виде высокотоксичен и реактивный. Хотя в данной концентрации продукт считается безопасным, мы все же настоятельно рекомендуем использовать его с осторожностью.
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При утилизации реагентов, содержащих Proclin 300, смойте их большим количеством воды, чтоб развести компоненты до неактивного уровня концентрации.
8. При работе с образцами и реагентами набора надевайте защитные перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

9. Не пипетируйте ртом.
10. Не ешь, пить, не курить и не наносить косметику на участках возле образцов или реагентов набора
11. Избегайте контакта между забуференным раствором пероксидазы и легкоокисляющимися материалами; высокие температуры могут спровоцировать непроизвольное воспламенение.

В процессе использования всех реагентов набора, контролей и образцов сыворотки соблюдайте действующее законодательство и указания по контролю качества.

**СОСТАВ НАБОРА**

**Размер упаковки на 96 определений**

Делимый микропланшет, состоящий из 12 модулей 8 лунок каждый, покрытый высокоочищенным человеческим Альбумином. Готов к использованию	1
Стандарты Микроальбумина (A-F) в PBS/BSA буферной матрице (NaN3 < 0.1%(w/w), Содержание микроальбумина: 0.15; 1.5; 6; 25; 100 и 400 мкг/мл. Готов к использованию.	6 пузырьков, 0.5 мл каждый
Контроли Микроальбумина в в PBS/BSA буферной матрице (NaN3 с) (положительный (1) и 2 отрицательный (2), для соответствующих концентраций см. включенный листок - вкладыш в упаковке. Готов к использованию.	2 пузырька, 0.5 мл каждый
Буфер для образцов, желтый, готов к использованию	1 пузырек, 10 мл
Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 <0.5% (v/v) (светло-красный), раствор, содержит поликлональный кроличий анти-человеческий Альбумин, меченный с пероксидазой хрена. Готов к использованию.	1 пузырек, 15 мл
Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию.	1 пузырек, 15 мл
Стоп-раствор (1 М соляная кислота). Готов к использованию.	1 пузырек, 15 мл
Буферизованный промывочный раствор (PBS, NaN3 < 0.1%(w/w), концентрат (50x)	1 пузырек, 20 мл

**ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ**

1. Хранить набор при 2 - 8 °С.
2. Хранить лунки микропланшета запечатанными в сухом мешочке с осушителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока годности.
4. Не подвергайте реагенты воздействию тепла, солнца или сильного освещения во время хранения и использования.
5. Разбавленные буфер для образца и промывочный буфер стабильны на протяжении как минимум 30 дней в условиях хранения при 2 – 8 °С.

**НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

**Оборудование**

- Считывающее устройство для микропланшетов, способное измерять результат при 450 нм.
- Мультиканальный диспенсер или повторная пипетка на 100 мкл
- Вихревая мешалка
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- Программное обеспечение обработки данных

**Подготовка реагентов**

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Мерный цилиндр на 100 и 1000 мл
- Пластмассовая тара для хранения промывающего раствора

**ОТБОР ОБРАЗЦА, ХРАНЕНИЕ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ**

Для определения Альбумина моча - предпочтительная среда.

Образцы мочи не должны быть разбавлены. Если ожидаются более высокие концентрации, разбавьте образцы буфером для образцов.

Разбавление нужно рассмотреть во время вычисления.

Пациентам не нужно голодать, а также не требуется никаких специальных приготовлений. Соберите утреннюю мочу.

Образцы могут храниться охлажденными в 2 - 8 °С до 5 дней. Для более длительного хранения образцов (до шести месяцев) их надо заморозить до - 20 °С. Во избежание повторенного размораживания и замораживания разделите образцы на аликвоты.

**ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ**

1. Не используйте компоненты набора по окончании срока годности.
2. Не меняйте компоненты различных лотов.
3. Все компоненты должны быть доведены до комнатной температуры (20-28°C) перед использованием.
4. Перед началом проведения анализа подготовьте все реагенты и образцы. Для получения наиболее надежных и точных результатов, анализ должен быть проведен без прерываний.
5. Выполняйте этапы исследования только в указанном порядке.
6. Всегда используйте свежие разбавления образцов.
7. Капайте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Во избежание контаминации, меняйте наконечники между образцами контролями набора.
9. Для получения наилучших результатов очень важно тщательно промывать лунки и удалять промывочный буфер до последней капли.
10. Необходимо точно придерживаться времени инкубации.
11. Контрольные сыворотки или пулы должны анализироваться как неизвестные для проверки работы реагентов и анализа.
12. Не используйте лунки повторно.

Соответствующие концентрации всех контролей указаны на этикетках каждого флакона. Используя эти концентрации, можно высчитать калибровочную кривую для прочтения результатов пациента полуколичественным методом.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

**Подготовка промывочного раствора**

## Microalbumin ELISA (EIA-3881)

Разбавьте содержимое каждого пузырька концентрата буферизованного промывочного раствора (50x) с дистиллированной или деионизированной водой до 1000 мл перед использованием. Хранить охлажденным: стабилен при 2 - 8 °С до 30 дней после приготовления или до окончания срока годности, напечатанного на ярлыке.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Подготовить достаточное число модулей микропланшета, чтобы приспособить калибраторы, контроли и образцы в дубликатах.
2. Отмерить пипеткой **20 мкл стандартов, контролей и неразбавленных образцов пациента** в лунки.
3. Добавить **100 мкл раствора ферментного конъюгата** в каждую лунку.
4. Инкубировать в течение **30 минут** при (20-28°C) комнатной температуре.
5. Удалить содержание микролунок и промыть **3 раза с 300 мкл промывочного раствора**.
6. Распределить **100 мкл раствора субстрата ТМБ** в каждую лунку.
7. Инкубировать в течение **15 минут** в комнатной температуре.
8. Добавить **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку модулей и оставить на 5 минут.
9. Читать оптическую плотность при **450 нм** и вычислить результаты. Рекомендуется двухцветное измерение со сравнением при 600-690 нм.

**Образовавшееся окрашивание стабильно до 30 минут.**

**Считайте оптические плотности в этом интервале времени.**

### Автоматизация

Данный набор подходит для использования на открытых автоматизированных ИФА-процессорах. Описанная выше процедура анализа может использоваться как с, так и без автоматизации.

### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### Контроль качества

Данный анализ действителен только в том случае, если оптическая плотность при 450 нм положительного контроля (1) и отрицательного контроля (2), а также стандарта А и F находится в пределах диапазона значений, указанного в сертификате контроля качества, который поставляется вместе с набором. Если какой-либо из критериев не соблюдается, результаты следует считать недействительными, а анализ повторить.

#### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для теста на Микроальбумин рекомендуется 4-х параметровая кривая с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации. Также являются подходящими аппроксимация Сглаженного Сплайна и логарифмо-логарифмические координаты.

#### РЕКОМЕНДОВАННЫЙ ЛИНЕЙНО-ЛОГАРИФМИЧЕСКИЙ ГРАФИК

Сначала вычислите усредненные оптические плотности для каждой лунки с калибратором. Используйте миллиметровку для построения графика зависимости усредненной оптической плотности каждого калибратора от концентрации. Начертите наиболее подходящую кривую, аппроксимирующую траекторию всех точек калибратора. Точки калибратора могут также быть связаны с прямыми линейными сегментами. Концентрация неизвестных образцов может тогда быть оценена от калибровочной кривой с помощью интерполяции. Необходимо учитывать разбавления образцов мочи.

### Интерпретация результатов

При проведении испытания на Микроальбумин с образцами мочи от здоровых доноров был установлен следующий диапазон:

**образцы мочи: 0 - 25 мкг/мл Альбумина**

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила ее собственные нормальные и патологические диапазоны уровней мочи.

### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

#### Параллелизм

Во время экспериментов с разбавлением образцов мочи при высокой концентрации альбумина эти образцы были разбавлены буфером для образцов и испытаны в наборе Микроальбумина. Анализ показал линейность по полному диапазону измерений.

#### Точность

Статистические данные были рассчитаны для каждого из трех образцов по результатам 24 определений за одну постановку для точности внутрипостановочного анализа. Точность от постановки к постановке была рассчитана по результатам 5 различных постановок с 6 определениями в каждой:

Внутрипостановочный анализ			Межпостановочный анализ		
Образец №	Среднее (мкг/мл)	КВ (%)	Образец №	Среднее (мкг/мл)	КВ (%)
1	25.2	5.3	1	24.8	4.2
2	50.9	3.3	2	50.1	5.1
3	80.2	3.6	3	78.6	2.9

### Чувствительность

Минимальный предел чувствительности для Микроальбумина составил 0.5 мкг/мл.

### Специфичность

Антисыворотка (поликлональная, кроличья) маркированная пероксидазой хрена, высоко специфична к человеческому Альбумину.

### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор является вспомогательным средством в диагностике и сам по себе не является диагностикой. Определенный клинический диагноз не должен основываться только на результатах одного анализа; он должен быть поставлен доктором после оценки и анализа клинических и лабораторных исследований.

**ЛИТЕРАТУРА** (см. в оригинале инструкции)

### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Тел/факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

