

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «ДИАКОН»



Карпова И.Е.

2010 г.

ОКП 93 9817

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для иммуноферментных анализов in vitro
«NGAL быстрый ИФА тест» (NGAL Rapid ELISA Kit)
производства BioPorto Diagnostics A/S, Дания

2010

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	3
2. ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
3. СОСТАВ НАБОРА.....	5
4. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ.....	5
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
6. СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ.....	6
7. СБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.....	7
8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ.....	7
9. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ.....	8
10. ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ.....	8
11. СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.....	9
12. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	9
13. ВАЛИДАЦИЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ.....	10
14. ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ КАЛИБРАТОРОВ.....	11
15. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	11
16. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА АНАЛИЗА.....	11
17. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА.....	12
18. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ.....	12
19. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	12
20. Условные обозначения на упаковке.....	13

1. ВВЕДЕНИЕ.

Набор реагентов для иммуноферментных анализов *in vitro* «NGAL быстрый ИФА тест» (NGAL Rapid ELISA Kit) предназначен для определения *in vitro* человеческого NGAL в моче, плазме или сыворотке крови с целью диагностики острой почечной недостаточности (ОПН).

NGAL (липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов), открытый в 1989 г., принадлежит к семейству липокалиновых белков. Как правило, это небольшие секретируемые белки, которые характеризуются способностью связывать гидрофобные молекулы в пространственно-структурных карманах, образуемых β -складчатостью, также связываться со специфическими рецепторами клеточной поверхности и формировать макромолекулярные комплексы. NGAL был полностью описан и назван в 1993 году, но он до сих пор имеет множество синонимов: он также известен как NL (липокалин нейтрофилов или HNL - липокалин нейтрофилов человека), липокалин 2, онкогенный белок 24p3 или утерокалин (мышь) и нейтрофил-связанный липокалин или 25 кДа α 2-микроглобулин-связанный протеин (крысы). NGAL человека состоит из единичной полипептидной цепи с дисульфидным мостиком, состоящей из 178 аминокислотных остатков с примерной молекулярной массой 22 кДа, в гликозилированном виде – 25 кДа. В нейтрофилах (нейтрофильных полиморфноядерных лейкоцитах) он встречается в виде мономера и димера с небольшой примесью тримера, а также в комплексе с 92-кДа коллагеназой нейтрофилов человека IV типа, которая также называется желатиназой В или матричной металлопротеиназой-9 (ММП-9).

NGAL был первоначально выделен из супернатанта активированных нейтрофилов человека, но он также экспрессируется в небольших количествах и в других тканях человека, включая почки, предстательную железу и эпителий дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. В больших количествах он вырабатывается в аденомах и воспаленном эпителии кишечника, аденокарциноме молочной железы и уротелиальных карциномах.

Благодаря своему своему малому молекулярному размеру и устойчивости к деградации, NGAL легко экскретируется и обнаруживается в моче как в свободном виде, так и в комплексе с ММП-9. Уровень NGAL в моче коррелирует с уровнем в плазме или сыворотке крови независимо от причины увеличения его выработки, но особенно высокий уровень в моче появляется тогда, когда NGAL выделяется непосредственно в мочу клетками почечных канальцев или уротелиальными карциномами. Пока не ясно, выделяется ли в мочу комплекс NGAL-ММП-9 из тканей, удаленных от мочевых путей или такой комплекс образуется прямо в моче из независимо выделенных NGAL и ММП-9.

Хотя функции NGAL полностью не поняты, предполагается, что выделение NGAL регулируется в клетках, находящихся в состоянии стресса, например, в результате инфекции, воспаления, ишемии или опухолевой трансформации, либо в тканях, в которых происходят инволюция, например, в матке мыши после родов и молочной железы после прекращения лактации. В качестве возможного антибактериального агента NGAL связывает энтеробактин и другие сидерофоры, лишая микроорганизмы Fe^{3+} - важного элемента для их питания. Образование комплекса с ММП-9, видимо, защищает ферментативную активность ММП-9 от деградации. Присутствие NGAL в тканях с инволюцией привело к предположению, что он играет роль в апоптозе, но более вероятным кажется то, что NGAL связан с выживанием клеток.

NGAL и почки. Еще в 1989 году было установлено, что уровень NGAL (24p3), вырабатываемый клетками почек мыши, претерпевает раннее сильное изменение (14-20-кратное) в ответ на инфекцию SV40 вируса. Аналогичная ранняя и сильная регуляция была обнаружена позже и при других типах повреждения почки; как оказалось, подъем уровня NGAL в плазме крови сильно коррелировал со снижением функции почек у больных с повреждением почек в результате системного васкулита. Уровень NGAL в моче служит ранним маркером острого повреждения почки после хирургии с использованием аппарата искусственного кровообращения (АИК), повышение уровня NGAL как в моче, так и в плазме

крови уже на ранней стадии сигнализирует об остром повреждении почек у пациентов в отделениях интенсивной терапии. Повышенные уровни NGAL в моче и плазме также наблюдаются у больных с хроническими почечными заболеваниями и у больных с пересаженной почкой (обнаружено с помощью Вестерн-блоттинга). Поэтому очевидно, что широкий спектр болезней почек связан с повышенными уровнями NGAL в плазме и моче. Хотя уровни NGAL в плазме и моче тесно связаны с острыми воспалительными состояниями, можно ожидать, что уровень NGAL в моче будет особенно высоким после достаточно серьезного повреждения почки, которое может привести к острой почечной недостаточности, острому тубулярному некрозу или острой тубулоинтерстициальной нефропатии.

Тем не менее, NGAL можно использовать в качестве маркера нарушения функции почек при условии, что одновременно учитываются другие взаимозависимые причины, имеющие отношение к повышению уровня NGAL.

NGAL при воспалении или инфекции. NGAL высвобождается из специфических гранул активированных нейтрофилов, и его уровень в плазме повышается при воспалении и инфекции, особенно бактериальной. Таким образом, сывороточный NGAL был предложен в качестве маркера бактериальной инфекции. Однако уровень NGAL может повышаться также при неоплазии и почечных заболеваниях независимо от инфекционного процесса, поэтому к такому применению следует относиться с осторожностью. Уровень NGAL может подниматься при инфекции у пациентов с низким неопределяемым уровнем нейтрофилов в связи с лейкоемией или лечением лейкоемии, что доказывает, что источником повышения NGAL при инфекции служат не только нейтрофилы.

NGAL и неоплазия. Выше были описаны различные виды злокачественных заболеваний, при которых может меняться уровень NGAL (часто вместе с ММП-9). Об этом свидетельствует его экспрессия в опухолевых клетках и повышенный уровень в моче, как в свободной форме и комплексе с ММП-9. Более того, предполагается, что комплекс NGAL-ММП-9 может служить в качестве маркера статуса онкологического заболевания при раке молочной железы. Плазматические уровни NGAL в таких случаях обычно не измеряются.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА.

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводится в микролунках, покрытых мышиными моноклональными антителами против человеческого NGAL. Связавшийся с антителами NGAL детектируется с помощью мышиных моноклональных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP). Окраска развивается в процессе инкубации с цветообразующим субстратом.

Анализ является быстрой двухшаговой процедурой:

Шаг 1. Аликвоты калибраторов, разведенных образцов и внутрилабораторных контролей инкубируют с конъюгатом детектирующих HRP-антител в покрытых антителами микролунках. При этом только NGAL связывается как с покрывающими микролунку, так и с детектирующими антителами, а несвязанный материал удаляется при промывке микролунок.

Шаг 2. В каждую микролунку добавляют хромогенный субстрат пероксидазы, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ). При этом образуется иммунный комплекс: конъюгат NGAL-антител с пероксидазой хрена / NGAL / NGAL-антитела, покрывающие микролунки. Пероксидаза хрена, пришитая к антителам, вступает в реакцию с субстратом и образует окрашенный продукт. Ферментативная реакция останавливается химически добавлением кислоты. Интенсивность окраски определяется на любом иммуноферментном ридере для микропланшетов при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски (оптического поглощения) зависит от концентрации NGAL, внесенного в каждую лунку. Результаты калибраторов используются для построения калибровочной кривой, с которой считываются концентрации NGAL в исследуемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА.

№	Содержимое	Количество
1	Микропланшет стрипованный покрытый антителами 96-луночный в рамке-держателе (12 x 8 coated Microwells + Frame)	1 шт.
2	Разбавитель для образца 5-кратной концентрации (5x Sample Diluent Conc.)	1 фл. x 60 мл
3	Калибраторы NGAL быстрого теста 1 - 6 (NGAL Rapid Calibrator 1-6)	6 фл. x 1 мл
4	Промывочный раствор 25-кратной концентрации (25x Wash Solution Conc.)	1 фл. x 30 мл
5	Конъюгат NGAL-антител с пероксидазой хрена (HRP-conjugated NGAL Antibody)	1 фл. x 6 мл
6	ТМБ субстрат (TMB Substrate)	1 фл. x 12 мл
7	Стоп-раствор (Stop Solution)	1 фл. x 16 мл
8	Микропланшет полипропиленовый круглодонный 96-луночный (Polypropylene U-Mircowell Plate)	
9	Схема внесения реагентов	1 шт.
10	Сертификат контроля качества	1 шт.
11	Краткое руководство	1 шт.
12	Инструкция по применению	1 шт.

Примечания:

-Жидкие реагенты содержат консерванты - Тимеросал или Бронидокс L (менее 1%). Опасно при попадании внутрь организма.

-Ни один из компонентов не содержит опасных ингредиентов в количестве, которое требует идентификации и маркировки в соответствии с директивами СЕ.

4. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ.

1. Регулируемые микропипетки на объем 1-1000 мкл и соответствующие одноразовые наконечники для пипеток
2. Полипропиленовые микропробирки объемом до 1000 мкл
3. Штативы для пробирок
4. Регулируемые 8- или 12-канальные микропипетки (на 50-250 мкл) или микропипетки с повтором (опционально)
5. Чистые 1-литровый и 500-миллилитровый градуированные цилиндры
6. Деионизированная или дистиллированная вода
7. Крышка для микропланшеты
8. Чистый флакон для разбавленного промывочного раствора
9. Аппарат для промывки лунок (вошер) (опционально)
10. Безворсовые бумажные полотенца или фильтровальная бумага
11. Одноразовые резервуары для пипетирования
12. Таймер (на 60-минутный интервал)
13. Калиброванный ИФА-ридер для микропланшетов с длиной волны считывания 450 нм (желательно с дополнительными референтными длинами волн 650 и 620 нм)
14. Натрия гипохлорит (хозяйственный отбеливатель в разведении 1:10) для обеззараживания образцов, реагентов и материалов

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Только для профессионального использования в *in vitro* диагностике.

1. Набор может использоваться только квалифицированным персоналом.
2. Используйте отдельные наконечники для каждого образца, калибратора и реагента во избежание перекрестного загрязнения.
3. Используйте отдельные резервуары для каждого реагента, особенно это относится к ТМВ субстрату.
4. После работы проведите обеззараживание всех образцов, реагентов и материалов путем замачивания как минимум на 30 минут в растворе гипохлорита натрия (хозяйственный отбеливатель в разведении 1:10).
5. Для предотвращения каплеобразования и загрязнения воздуха во время промывки лунок проводите аспирацию во флакон с гипохлоритом натрия.
6. Не допускать попадания в окружающую среду. Утилизировать тару и неиспользованное содержимое безопасным способом в соответствии с национальными и местными правилами.
7. Стоп-раствор содержит серную кислоту 0,5 моль/л и может вызывать повреждения и ожоги кожи и глаз. В случае случайного контакта немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью.
8. Не смешивайте компоненты наборов из разных лотов. Компоненты стандартизованы как отдельные единицы для каждого лота.
9. Гемолизные, гиперлипемичные, подвергшиеся термообработке или загрязненные образцы могут давать неверные результаты.
10. Не разводите клинические образцы непосредственно в покрытых антителами рабочих лунках.
11. Не прикасайтесь и не скребите дно рабочих лунок во время пипетирования, промывки или аспирации.
12. Несоблюдение времени и температуры инкубации может привести к получению неверных результатов.
13. Не допускайте пересыхания лунок в процессе проведения анализа.
14. ТМВ субстрат чувствителен к свету. Не храните его на ярком свету.
15. Не используйте лунки повторно и не сливайте реагенты обратно во флаконы.

6. СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ.

1. Хранить набор со всеми реагентами при 2-8°C. Не замораживать.
2. Использовать все реагенты до окончания срока годности, указанного на этикетке набора.
3. Разведенный концентрат промывочного раствора остается стабильным до 4 недель при температуре +2-8°C. Если для анализа используются не все лунки, рекомендуется разводить только порцию концентрата промывочного раствора, необходимую для проведения анализа.
4. Разведенный концентрат разбавителя для образца остается стабильным до 24 часов при температуре 2-8°C. Если для анализа используются не все лунки, рекомендуется разводить только порцию концентрата разбавителя для образца, необходимую для проведения анализа.
5. Хранить неиспользованные стрипованные микролунки в плотно запечатанном фольгированном пакете с вложенным осушителем. Перед открытием фольгированного пакета необходимо довести его до комнатной температуры, чтобы избежать конденсации влаги в лунках, покрытых антителами.

7. СБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Обращайтесь с образцами крови или мочи как с потенциально инфекционными. (См. меры предосторожности в разделах 2, 4 и 5).

Для определения NGAL в единичном образце требуется 10 мкл мочи, плазмы или сыворотки. Образцы крови должны собираться в стерильные пробирки с ЭДТА или обычные пробирки квалифицированным персоналом с использованием стандартной процедуры венепункции. Плазма или сыворотка должна быть получена при помощи стандартной клинической лабораторной процедуры. Моча должна быть отцентрифугирована. Накрывайте крышками подготовленные клинические образцы. Если анализ не может быть проведен в ближайшие 24 часа или образец необходимо транспортировать, заморозьте его при -20°C или ниже. Для длительного хранения образцов рекомендуется температура -70°C и ниже. Не допускайте повторной заморозки и оттаивания образцов. Не используйте гемолизные, гиперлипемичные, подвергшиеся термообработке или загрязненные образцы.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ.

1. Доведите все образцы и реагенты до комнатной температуры ($20-25^{\circ}\text{C}$). Тщательно перемешайте образцы с помощью осторожного переворачивания. Если необходимо, осветлите образец путем низкоскоростного центрифугирования.
2. Определите количество образцов для тестирования (в повторях) плюс необходимое количество образцов для внутрилабораторного контроля качества (в повторях), плюс необходимое количество свободных лунок для бланка реагентов. Покрытые антителами микролунок могут использоваться как 8 стрипов или как отдельные лунки. Одиночные микролунок отделяются от стрипа путем отламывания и помещаются в соответствующую позицию рамки-держателя. Буквы и зарубки на микролунках позволяют их идентифицировать. Добавьте 12 микролунок для 6 калибраторов (в повторях). Уберите оставшиеся неиспользованными микролунок в фольгированный пакет с осушителем, плотно закройте его и храните при $2-8^{\circ}\text{C}$.
3. Промывочный раствор: разведите 25-кратный концентрат промывочного раствора, вылив все содержимое флакона (30 мл) в 1-литровый градуированный цилиндр и добавив дистиллированной или деионизированной воды до конечного объема 750 мл. Тщательно смешайте, неиспользованные остатки храните при $2-8^{\circ}\text{C}$. Если используются не все микролунок, разведите только требуемое количество концентрата промывочного раствора с 24 объемами воды (конечное разведение 1/25).
4. Разбавитель для образца: разведите 5-кратный концентрат разбавителя для образца (содержащего красный краситель для облегчения пипетирования), вылив все содержимое флакона (60 мл) в 500-миллилитровый градуированный цилиндр и добавив дистиллированной или деионизированной воды до конечного объема 300 мл. Тщательно смешайте, неиспользованные остатки храните при $2-8^{\circ}\text{C}$. Если используются не все микролунок, разведите только требуемое количество концентрата разбавителя для образца с 4 объемами воды (конечное разведение 1/5).
5. Калибраторы NGAL быстрого теста (содержат красный краситель для облегчения пипетирования): Соответствующие концентрации указаны на этикетках флаконов. Не требуют разведения.
6. Конъюгат NGAL-антител с пероксидазой хрена (готов к использованию): не требует разведения.
7. ТМВ субстрат (готов к использованию): не требует разведения.
8. Стоп-раствор (готов к использованию): не требует разведения.

9. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ.

Приблизительный диапазон стандартной кривой 0,2-20 нг/мл и соответствующие диагностические диапазоны 100-500 нг/мл для плазмы или сыворотки и 50-500 нг/мл мочи (см. Интерпретация результатов). Поэтому для первоначального скрининга рекомендуется разведение 1/100 для плазмы или сыворотки и 1/50 для мочи. Разведение 1/100 может быть получено путем разведения 10 мкл плазмы или сыворотки с 990 мкл разбавителя для образца, а разведение 1/50 можно приготовить путем разведения 10 мкл мочи с 490 мкл разбавителя для образца. Полученные разведенные образцы тщательно смешиваются либо вручную, переворачиванием закрытых крышками микропробирок, либо на вортексе при умеренной скорости перемешивания. Может потребоваться повторный анализ образцов вне диапазона калибровки (как более низкое, так и более высокое разведение). Разведения ниже, чем 1/25, не используются.

10. ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ.

(см. также схему проведения анализа)

1. Подготовить протокол анализа, выбрав соответствующие микролунки для калибраторов, разведенных образцов пациента и образцов внутрилабораторного контроля в двух повторях. Если на ИФА-ридере отсутствует референтная длина волны 650 или 620 нм, также можно отвести лунки для холостой пробы. В эти лунки нужно внести по 50 мкл разбавителя для образца, и дальнейшие процедуры провести согласно общей процедуре тестирования.

2. Развести тестируемые образцы в соответствии с ожидаемыми концентрациями NGAL (1/100 для плазмы или сыворотки и 1/50 для мочи пригодны для большинства образцов).

3. Распипетировать достаточные объемы (более 50 мкл) каждого калибратора, разведенной пробы и образцов внутрилабораторного контроля качества в соответствующие протоколу анализа лунки на полипропиленовом круглодонном 96-луночном микропланшете. Полипропиленовый микропланшет используется только как вспомогательное место кратковременного хранения образцов до их перенесения в рабочие лунки.

4. Распипетировать по 50 мкл конъюгата NGAL-антител с пероксидазой хрена в соответствующие позиции лунок рабочего микропланшета. Затем быстро перенести многоканальной пипеткой по 50 мкл растворов калибраторов, разведенных образцов и внутрилабораторных контролей из U-лунок в соответствующие рабочие микролунки, уже содержащие детектирующие антитела. Этот метод внесения образцов рекомендуется для того, чтобы уменьшить разницу во времени инкубации между первым и последним образцами, вносимыми в рабочие лунки.

5. Накрыть микролунки и инкубировать **30 минут** при комнатной температуре на шейкере со скоростью 200 об./мин.

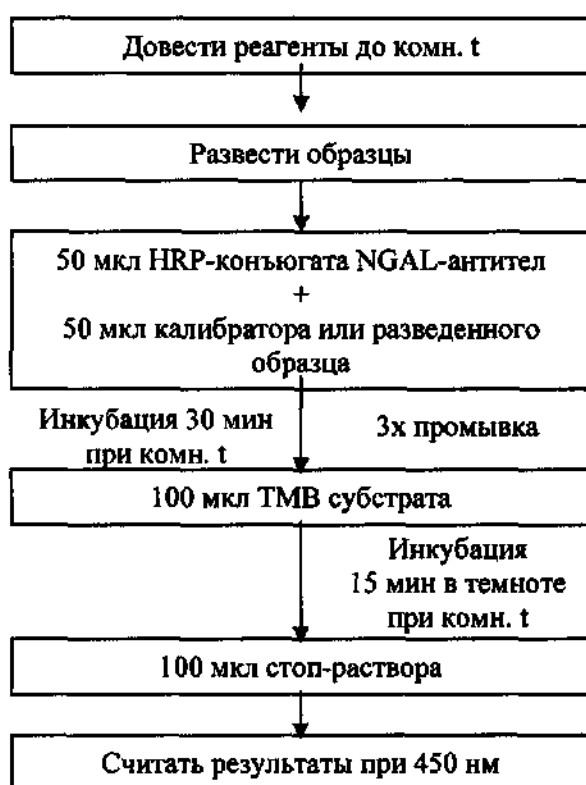
6. Аспирировать содержимое микролунок и промыть лунки трижды, используя как минимум 300 мкл предварительно разведенного промывочного раствора. Если промывка осуществляется вручную, опорожняйте лунки опрокидыванием и осторожным встряхиванием в подходящую емкость, а затем промокните их в перевернутом положении о бумажное полотенце. Необходимо оставлять в лунках промывочный раствор хотя бы на 1 минуту до опорожнения. Это рекомендуется, по крайней мере, в последнем промывочном цикле. От силы, с которой рабочий промывочный раствор заполняет лунки и удаляется из них, зависит развитие окончательной окраски. Ручное пипетирование промывочного раствора может быть слишком слабым и может приводить к избыточной окраске, промывка вручную рекомендуется только при отсутствии альтернатив, таких, как заполнение лунок с помощью многоканального ручного промывочного диспенсера или с использованием автоматического промывочного аппарата (вошера).

7. Внести по 100 мкл ТМБ субстрата (готового к использованию) в каждую микролунку. Рекомендуется использовать многоканальную микропипетку для уменьшения времени пипетирования. Накрыть лунки и выдержать **ровно 15 минут** при комнатной температуре в темном месте. Начать отсчет времени при заполнении первой лунки.

8. Добавить по 100 мкл стоп-раствора (готового к использованию) в каждую лунку, сохраняя ту же последовательность и скорость пипетирования, как в шаге 7. Осторожно смешать взбалтыванием в течение 20 секунд, избегая разбрызгивания. Считать результаты тестирования на ридере в пределах 30 минут после остановки реакции.

9. Считайте поглощение в лунках при 450 нм в соответствующем микропланшетном ридере (с референтной длиной волны 650 или 620 нм). Если референтной длины волны нет, поглощение холостой пробы вычитается из величины оптической плотности каждой лунки перед проведением расчета концентраций.

11. СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.



12. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Для расчета результатов должны использоваться точные концентрации калибраторов, напечатанные на этикетках флаконов и в сертификате контроля качества.

Основной принцип заключается в построении калибровочной кривой по средним значениям оптического поглощения каждого калибратора, отложенным по оси ординат (y) и соответствующих им концентрациям NGAL в нг/мл, отложенным по оси абсцисс (x). Калибровочная кривая должна удовлетворять требованиям валидации. Концентрация NGAL в каждом разведенном образце определяется путем нахождения соответствующей среднему поглощению образца точки на калибровочной кривой и соответствующей ей концентрации в нг/мл на оси x. Концентрация NGAL в неразведенных образцах рассчитывается путем умножения полученного результата на соответствующий коэффициент разведения образца.

Построение калибровочной кривой может быть выполнено вручную с помощью миллиметровой бумаги с линейными x - и y -шкалами. Можно провести через отложенные точки сглаженную кривую или соединить точки прямыми линиями. Последняя процедура может несколько завышать значения концентрации между точками построения, поскольку обычно кривая имеет легкую выпуклость влево. Хотя калибровочная кривая может приближаться к прямой линии, практически и теоретически неправильно рассчитывать и строить прямую калибровочную линию и затем рассчитывать по ней результаты.

Построение калибровки может также обеспечиваться за счет программного обеспечения ИФА-ридера. Используется процедура выбора линейных осей x и y с установками 4-параметровой логистической кривой. Разведенные образцы, которые дают среднее поглощения выше, чем Калибратор 6 или ниже, чем Калибратор 2 находятся вне области анализа и их концентрации следует отметить как > 20 нг/мл и $< 0,2$ нг/мл соответственно. Соответствующие концентрации в неразбавленном образце рассчитываются как $> (20 \times \text{коэффициент разведения})$ нг/мл и $< (0,2 \times \text{коэффициент разведения})$ нг/мл соответственно. При необходимости эти образцы могут быть протестированы повторно с большим и меньшим разведением для образцов с высоким и низким поглощением соответственно. Новые коэффициенты разведения должны быть такими, чтобы ориентировочно давать значения абсорбции, которые вписываются в пределы калибровочной кривой, но разведения ниже $1/25$ не должны использоваться.

13. ВАЛИДАЦИЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ.

Средняя величина оптического поглощения Калибратора 6 NGAL быстрого теста должна быть $> 1,5$. Средняя величина оптического поглощения для любого другого калибратора должна быть выше, чем поглощение предыдущего калибратора, например поглощение Калибратора 6 должно быть выше поглощения Калибратора 5. Калибровочная кривая должна иметь легкую выпуклость влево при построении.

Выпадающие точки для отдельных калибраторов: Один или несколько отдельных калибраторов могут показать аномальное оптическое поглощение. Выпады могут наблюдаться на одном или обоих повторях, а также в среднем значении. Эта ошибка является серьезной, если невозможно построить удовлетворительную калибровочную кривую по 4-параметровому логистическому методу, и кривая смещается в сторону от точек построения по другим калибраторам, значения которых определены правильно. Точки калибраторов и построенная кривая всегда должны проверяться на предмет правильной подгонки до расчета концентрации образца. При неправильном построении калибровочной кривой будет также высокая сумма квадратов остатков. Если выпадает значение только одного, не самого высокого, калибратора, можно использовать два способа решения этой проблемы:

1) Исключить ошибочный единичный результат или результаты обоих повторов из калибровочной кривой, а для построения 4-параметровой логистической кривой использовать остальные результаты. Если подгонка кривой будет удовлетворительной, по ней можно рассчитывать предварительные результаты.

2) Если подгонка кривой таким способом невозможна, но других противоречий между точками построения кривой нет, предварительные результаты могут быть получены путем соединения отложенных точек прямыми линиями или методом простого кубического сплайна (сглаживания) с опусканием ошибочной точки.

Если ошибка наблюдается в результатах двух или более калибраторов, анализ необходимо повторить. Отклонение результатов может происходить из-за ошибки персонала или из-за порчи калибратора. Если результаты обоих повторов калибратора последовательно выпадают при проведении повторного тестирования, это означает, что калибратор испорчен, и его результаты следует исключить при построении калибровочной кривой.

14. ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ КАЛИБРАТОРОВ.

Концентрация NGAL в разведенном калибровочном материале была количественно определена методом ИФА сравнением с очищенным препаратом рекомбинантного человеческого NGAL (Rigshospitalet, Копенгаген, Дания).

15. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Обнаружение повышенных концентраций NGAL в моче, плазме или сыворотке крови не может быть самостоятельным диагностическим признаком какой-либо одной патологии. Как указано во введении, с повышенным уровнем NGAL в моче или плазме могут быть связаны различные заболевания.

Врачи должны интерпретировать значение повышенных уровней NGAL в моче или плазме с учетом клинических особенностей каждого пациента.

Возможности использования уровней NGAL в моче и плазме для диагностики острой почечной недостаточности, наступившей в результате предполагаемого повреждения почки, определялась в серии у 60 пациентов, поступивших в неспециализированные отделения интенсивной терапии и классифицированных по другим критериям, таким как наличие или отсутствие признаков почечной недостаточности. У многих из этих пациентов одновременно диагностировался сепсис и некоторые виды рака. Повышенные максимальные уровни NGAL были связаны с острой почечной недостаточностью, как показано в таблице ниже:

Острая почечная недостаточность

Образец	Моча	Плазма
Критический уровень (Cut-off)	350 нг/мл	400 нг/мл
Диагностическая специфичность	89,3%	96,3%
Диагностическая чувствительность	96,9%	84,8%
Положительная прогностическая значимость	91,2%	93,1%
Отрицательная прогностическая значимость	96,2%	83,9%

Концентрация NGAL в моче выше 350 нг/мл или в плазме выше 400 нг/мл связана с повреждением почки, которое может вести к острой почечной недостаточности (положительная прогностическая ценность >90%).

Концентрация NGAL ниже критического уровня может свидетельствовать не только о незначительном повреждении почки, но и о других патологиях.

Резкое повышение концентрации NGAL в моче по сравнению с предыдущим результатом пациента может свидетельствовать о повреждении почки, даже если критический уровень не превышен. В таких случаях рекомендуется тщательный контроль функции почек.

16. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА АНАЛИЗА.

Если в лаборатории предполагается проводить повторные анализы, то в ней следует создать свои собственные запасы контрольных образцов мочи и сыворотки с высокими и низкими концентрациями NGAL, хранящихся в небольших (например, 50 мкл) аликвотах при -70° С или ниже. При каждом проведении анализа аликвоту следует разморозить и протестировать, а результат записать и сохранить. Это необходимо для контроля тестирования, проверки качества реагентов и работы персонала. Результаты должны контролироваться на смещение (тенденция к увеличению или снижению последовательных результатов) или значительное отклонение от среднего значения предыдущих результатов. Результаты, которые отклоняются менее чем на 20% от средних значений предыдущего

анализа, могут считаться приемлемыми. Аликвоты контрольной сыворотки не должны замораживаться повторно; если в дальнейшем ожидается повторение анализов, необходимо использовать свежие алиquotы контроля и свежие разведения образцов больного.

17. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА.

Обнаружение повышенных концентраций NGAL в моче, плазме или сыворотке крови не может служить самостоятельным диагностическим критерием для какой-либо одной патологии. Как указано во введении, с повышенным уровнем NGAL в моче или плазме связаны разные независимые патологии. Врачи должны интерпретировать значение повышенных уровней NGAL с учетом клинических особенностей каждого пациента.

Критические уровни, показанные в интерпретации данных, базируются на основе максимальных значений в выборке описанных пациентов, у которых присутствуют несколько влияющих на результат факторов. Для других групп пациентов, с меньшим количеством влияющих на результат факторов, может быть целесообразным использовать другие, возможно, более низкие критические уровни. Внезапный подъем концентрации NGAL может указывать на острое повреждение почки, даже если уровень не превышает критические уровни.

18. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ.

Средний уровень NGAL в образцах от здоровых доноров составлял 63 нг/мл (диапазон 37–106 нг/мл, $n = 80$) в ЭДТА-плазме и 5,3 нг/мл (диапазон 0,7–9,8 нг/мл, $n = 7$) в моче. В случайной выборке пациентов отделений интенсивной терапии концентрация NGAL в моче находилась в пределах от 9 нг/мл до 40 000 нг/мл (40 мкг/мл) в моче ($n = 60$) и от 25 нг/мл до 3 491 нг/мл в ЭДТА-плазме ($n = 60$).

19. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

Предел определения: Наименьшая концентрация NGAL, дающая оптическое поглощение выше 2 SD по сравнению со средним значением нулевого уровня (Калибратор 1 NGAL быстрого теста) ($n = 8$) составляла 0,008 нг/мл, что было ниже уровня Калибратора 2 NGAL быстрого теста.

Воспроизводимость: Внутритестовая вариабельность теста определялась путем измерения NGAL в двух образцах мочи и двух образцах плазмы в 8 повторях. Результаты приведены в таблице ниже (CV = коэффициент вариации):

Образец	CV
Моча А	3,4%
Моча В	4,3%
Плазма А	2,9%
Плазма В	1,9%

Межтестовая вариабельность теста определялась путем измерения NGAL в 2 разведениях образцов мочи, и 2 разведениях образцов ЭДТА-плазмы в 2 повторях 4 различных анализов. Результаты приведены в таблице ниже:

Образец	CV
Моча А	4,7%
Моча В	22,7%
Плазма А	11,4%
Плазма В	12,4%

Аналитическое покрытие: Пробы мочи и плазмы обогащались рекомбинантным человеческим NGAL и тестировалась. Покрытие рассчитывалось из соотношения (Измеренное значение/Ожидаемое значение), выраженное в процентах.

Образец	Измеренное значение (диапазон)	Ожидаемое значение (диапазон)	Покрытие (диапазон)
Моча	4,3-12,0 нг/мл	4,5-12,4 нг/мл	93-98%
ПлазмаА	4,2-10,5 нг/мл	4,6-12,6 нг/мл	83-90%

Линейность: NGAL измерялся в серийных разведениях ($n = 8$) 2 образцов мочи и 2 образцов плазмы. CV среднего измеренного значения с поправкой на разведение составляло 9,9% и 12,5% для двух образцов мочи и 12,2% и 7,4% для двух образцов плазмы, показывая удовлетворительную линейность.

Влияние образца: Анализ образцов сыворотки крови, ЭДТА-плазмы или мочи не показал никаких существенных различий в аналитическом покрытии, линейности и воспроизводимости. Тем не менее, концентрации NGAL часто несколько выше в сыворотке крови, чем в плазме, вероятно, из-за высвобождения NGAL из нейтрофилов в процессе образования сгустка.

Специфичность: Было показано, что два вида мышиных моноклональных антител против человеческого NGAL, используемых в данном тесте, связываются с различными препаратами рекомбинантного человеческого NGAL и дают одну полосу в 25 кДа в Вестерн-блоттинге редуцированного постнуклеарного супернатанта из нейтрофилов человека.

20. Условные обозначения на упаковке:

	Каталожный номер		Срок хранения		Внимание, обратитесь к сопроводительной документации Биологический риск
	Изделие медицинского назначения для in vitro диагностики		Производитель		
	Номер лота		Оберегать от прямого солнечного света		Не использовать, если упаковка повреждена
	Читать инструкцию		Температура хранения		
	Соответствие европейским требованиям		Не использовать повторно		Концентрированный разбавитель для образца. Развести перед использованием