



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов «MMS-kit-SA01»
для определения функциональности альбумина
в сыворотке крови методом спинного зонда
(MMS-kit-SA01)

КТ-300-R

MedInnovation GmbH
Nonnendammallee 42-43, 13599 Berlin, Germany

Данные для идентификации набора реагентов находятся на этикетке, нанесенной на его упаковку, и содержат:

- Знак **IVD CE marking**;
- Наименование и адрес изготовителя **MedInnovation GmbH**;
- Наименование набора **"MMS-kit-SA01"**;
- Указание на использование только для лабораторных исследований: **Only for laboratory use In vitro**
- Код партии **Lot XXX**, где XXX – комбинация цифр и букв;
- Срок годности набора в формате **ГГГГ-ММ** (год-месяц);
- Указания по условиям хранения и транспортировки.

Изготовитель набора реагентов: **MedInnovation GmbH**.

Адрес: **Nonnendammallee 42-43, 13599 Berlin, Germany**.

Сервис-центр: **ESR-Analyselabor, Freiheitstrasse 124/126, 15745 Wildau, Germany**

Copyright © 2007, **MedInnovation GmbH**

Все права защищены

Версия от 16.04.2007

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ПРИНЦИП МЕТОДА	5
3. СОСТАВ НАБОРА.....	5
3.1 Срок годности.....	7
3.2 Условия и сроки хранения набора при транспортировке в первичном контейнере	7
3.3 Условия хранения набора реагентов после вскрытия первичного контейнера	7
3.4 Условия и сроки хранения реагентов после вскрытия пробирок с растворами спинного зонда	7
4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	7
4.1 Специфичность.....	7
4.2 Воспроизводимость.....	7
4.3 Линейность	7
4.4 Нормальные величины	8
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	8
7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	8
8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	9
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	9
10. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТА АНАЛИЗА	10
11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕАГЕНТОВ И МЕРЫ, ПРИНИМАЕМЫЕ ПРИ ОБНАРУЖЕНИИ ИЗМЕНЕНИЙ	10

1. Назначение

1.1. Набор реагентов “MMS-kit-SA01” предназначен для определения функциональности альбумина в образцах сыворотки и EDTA-плазмы крови человека методом спинного зонда (MMS-исследование) на лабораторном анализаторе электронного парамагнитного резонанса типа “ESR-Analysator MMS 01–08”.

1.2. Сывороточный альбумин – основной транспортный белок крови, главной физиологической функцией которого является транспорт жирных кислот, связывание эндотоксинов и их эвакуация к гепатоцитам. Альбумин обеспечивает также перенос билирубина и многих других метаболитов.

В процессе транспорта молекулы альбумина различным образом реагируют с переносимыми жирными кислотами, обеспечивая сначала их эффективную сорбцию и связывание при загрузке, а затем - эффективную диссоциацию при передаче клеткам-мишеням. Изменчивость связывающих свойств альбумина в процессе транспорта метаболитов обеспечивается за счет конформационной подвижности этого белка и аллостерических взаимодействий между его различными центрами связывания.

В крови молекулы альбумина частично загружены переносимыми метаболитами, состав и количество которых зависят от состояния организма и изменяются при развитии патологических процессов, что отражается на способности альбумина выполнять транспортные операции с жирными кислотами (его функциональности), и влияет на конформацию белка.

1.3. Метод оценки показателей функциональности сывороточного альбумина может быть использован в стационаре и при диагностических обследованиях с целью:

- диагностики и мониторинга нарушений транспортной системы крови при интоксикации;
- диагностики роста злокачественных новообразований (по выявлению специфического нарушения конформации молекул альбумина, вызываемого метаболитами злокачественного роста);
- мониторинга течения онкологических заболеваний.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа 75 проб.

1.5. Набор реагентов применяется в медицинских лабораторных исследованиях (in vitro диагностика).

1.6. Набор реагентов предназначен для качественного анализа – определения показателей функциональности сывороточного альбумина.

2. Принцип метода

Определение показателей функциональности сывороточного альбумина с помощью набора реагентов "MMS-kit-SA01" основано на методе спиновых зондов, теория и методики применения которого описаны в следующих книгах: 1) *Метод спиновых меток в молекулярной биологии*. Лихтенштейн Г.И. М., "Наука", 1974; 2) *Метод спинового зонда*. Кузнецов А.Н. М., "Наука", 1976; 3) *Метод спиновых меток*. Под ред. Л. Берпинера. М. "Мир", 1979).

Метод определения показателей функциональности сывороточного альбумина соответствует Европейскому Патенту EP 1269213 и Патенту России RU 2275648, и состоит в следующем:

- в исследуемой пробе индуцируют целенаправленные конформационные изменения молекул альбумина, для чего к трем аликвотам пробы добавляют три различных концентрации связывающегося с альбумином спинового зонда и дополнительно три различных концентрации этанола.
- Из спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) аликвот со спиновым зондом и этанолом, на основе компьютерной имитации и фитинга спектров ЭПР, определяют степень изменения параметров связывания спинового зонда в центрах связывания альбумина в зависимости от концентрации спинового зонда и концентрации этанола.
- Изменения транспортных свойств альбумина рассчитывают на основе изменений значений параметров связывания спинового зонда в зависимости от концентрации спинового зонда и этанола.

Для исследования берут три аликвоты образца сыворотки, которые смешивают с различными по концентрации этанольными растворами спин-меченой жирной кислоты (16-доксил-стеариновая кислота). Затем аликвоты инкубируют для прохождения реакции связывания спинового зонда центрами связывания альбумина. После инкубации аликвоты набирают в стеклянные капилляры, которые последовательно исследуют на анализаторе "ESR-Analysator MMS 01-08".

Анализатор регистрирует ЭПР-спектры спинового зонда в каждом капилляре, выполняет расчет параметров каждого спектра, и из их совокупности рассчитывает показатели функциональности альбумина в отношении жирных кислот: связывающую способность (BE), транспортную эффективность (RTQ), детоксификационную способность (DTE), а также показатель нативности конформации белка (DR).

Величины показателей функциональности альбумина выражаются в процентах к среднему значению нормы у взрослого человека, показатель нативности конформации выражается в условных единицах.

3. Состав набора

Комплектность набора реагентов указана в таблицах 1 - 3.

Набор содержит компоненты, различающиеся по условиям хранения, которые уложены в две упаковки. На упаковках нанесены идентификационная маркировка и указания по условиям хранения.

Набор не содержит токсичных, возгораемых и других опасных веществ.

Таблица 1. Комплектность набора реагентов

Обозначение (маркировка)	Наименование	Количество, шт.	Примечания
MMS-kit-SA01-R1	Комплект растворов	1	В составе согласно таблице 2
MMS-kit-SA01-R2	Комплект для проведения анализа	1	В составе согласно таблице 3
	Инструкция по применению	1	
	Паспорт на набор реагентов	1	
MMS-kit-SA01	Упаковка	1	

Таблица 2. Состав комплекта растворов MMS-kit-SA01-R1

Маркировка	Состав	Концентрация, ммоль/л	Объем, мл	Количество, шт.
S1 (желтая этикетка)	Раствор спинного зонда 16-доксил-стеариновая кислота в этаноле (в пробирке)	3,5	0,35	3
S2 (синяя этикетка)	Раствор спинного зонда 16-доксил-стеариновая кислота в этаноле (в пробирке)	5,8	0,4	3
S3 (красная этикетка)	Раствор спинного зонда 16-доксил-стеариновая кислота в этаноле (в пробирке)	7,5	0,45	3
MMS-kit-SA01-R1	Упаковка			1

Таблица 3. Состав комплекта MMS-kit-SA01-R2 для проведения анализа

Маркировка	Наименование	Количество, шт.
K1	96-луночный микро-планшет для инкубирования проб	3
K2	Крышка для планшета	1
K3	Стеклянные капилляры в упаковке (длина 125 мм, калиброванный объем 40 мкл)	250
K4	Резиновая пробка для капилляров	3
K5	Замазка для закупоривания капилляров, на подложке	1
K6	Пленка лабораторная для закрытия лунок планшета при инкубации, 50×10 см ²	1
MMS-kit-SA01-R2	Упаковка	1

3.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 2 года от даты производства.
Предельный срок хранения указан на упаковке.

3.2 Условия и сроки хранения набора при транспортировке в первичном контейнере

При транспортировке допускается хранение набора в первичной упаковке при температуре не выше 25°C в течение не более 7 дней.

3.3 Условия хранения набора реагентов после вскрытия первичного контейнера

Первичный контейнер (транспортная упаковка) с набором реагентов содержит две упаковки, в которые уложены компоненты набора.

Упаковка меньшего размера с маркировкой MMS-kit-SA01-R1 должна храниться при температуре минус 18 °C или ниже.

Упаковка с маркировкой MMS-kit-SA01-R2 содержит компоненты, которые не требуют специальных условий хранения и могут храниться в обычных лабораторных помещениях при температуре от 5 до 25 °C.

При хранении не допускается воздействие влаги и едких веществ (кислот, щелочей, органических растворителей и т.п.) или их паров на компоненты набора и их упаковку.

3.4 Условия и сроки хранения реагентов после вскрытия пробирок с растворами спинного зонда

Пробирки с растворами S1, S2 и S3 должны храниться при температуре не выше 4 °C в течение не более 2 месяцев после первого вскрытия.

4. Аналитические характеристики набора

4.1 Специфичность

Не менее 90% спинного зонда 16-доксил-стеариновая кислота связывается с альбумином в образцах сыворотки здоровых лиц, при концентрации альбумина больше 40 г/л.

4.2 Воспроизводимость

Коэффициенты вариации результатов определения показателей в одном и том же образце: для BE – не более 7%, RTQ – 7%, DTE – 10%.

Вариация результатов определения показателя DR не превышает 0,5 единиц.

4.3 Линейность

Зависимость показателя BE в растворах альбумина при разведении их физиологическим раствором (0,9% NaCl) имеет линейный характер в диапазоне концентраций альбумина от 20 до 60 г/л.

4.4 Нормальные величины

Нормальные величины показателей функциональности альбумина в сыворотке (EDTA-плазме) крови взрослого человека измеряли у 39 здоровых мужчин и 41 здоровых небеременных женщин. Диапазоны измеренных значений показателей составили:

- BE от 65 до 135% (среднее значение 100%);
- RTQ от 60 до 100% (среднее значение 82%);
- DTE от 40 % до 175% (среднее значение 100%);
- DR от 1,0 до 5,5 (среднее значение 3).

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон нормальных величин у обследуемого контингента.

5. Меры предосторожности

При работе с данным набором необходимо соблюдать правила безопасности, рекомендуемые при работе с кровью и ее компонентами в клиничко-диагностических лабораториях лечебных учреждений.

При работе с набором следует надевать одноразовые пластиковые или резиновые перчатки, так как образцы крови человека являются потенциально опасным инфицированным материалом, способным длительно сохранять и передавать возбудители вирусных инфекций.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

6. Оборудование и материалы

Для выполнения анализа необходимо следующее оборудование:

- Анализатор электронного парамагнитного резонанса лабораторный типа "ESR-Analysator MMS 01-08"
- Пипетка, позволяющая отбирать объем жидкости 40 мкл для наполнения капилляров, с наконечником для микропипетки с резиновой трубкой (из комплекта принадлежностей анализатора)
- Центрифуга лабораторная на 1000 -1500 g
- Планшетный шейкер с терморегуляцией (37 °C)
- Пробирки для сыворотки (емкостью 2 – 5 мл, например S-Monovette®)
- Пипетки, позволяющие дозировать объемы жидкости 10, 12, 14 и 50 мкл, со сменными наконечниками
- Подставка для капилляров.

7. Анализируемые образцы

С помощью набора реагентов "MMS-kit-SA01" исследуют нативные или размороженные после замораживания образцы сыворотки либо ЭДТА-плазмы крови (0,2 мл).

Забор проб цельной крови следует производить путем обычной венопункции в объеме 3 - 5 мл.

Цельную кровь набирают в пробирки и центрифугируют в течение 10 минут при 1000-1500 g. Затем сыворотку отбирают в пробирки, обращая внимание на ее гомогенность. При негомогенности сыворотки центрифугирование следует повторить.

Не рекомендуется использовать вакуумные системы забора крови, например, типа Vacutainer®.

Сыворотку до момента проведения исследования можно хранить максимально в течение 5 дней при 4 °C, либо максимально в течение 6 месяцев при температуре не выше минус 30 °C.

Размораживать пробирки с замороженной сывороткой необходимо быстро, в воде при температуре 37 °С, после размораживания исследование должно быть проведено не более чем в течение 2 часов.

Повторное замораживание-размораживание образцов сыворотки или плазмы не допускается.

8. Подготовка реагентов для анализа

Перед вскрытием пробирки с реактивами S1, S2 и S3 необходимо выдержать при комнатной температуре (18 – 25 °С) не менее 60 минут.

В случае длительного хранения набора до использования (более 3 месяцев), выполнить проверку концентрации спинного зонда в пробирках S1, S2 и S3 на анализаторе "ESR-Analysator MMS 01–08" (см. Инструкцию по эксплуатации лабораторного анализатора "ESR-Analysator MMS 01–08").

9. Проведение анализа

9.1. Анализ должен проводиться в лабораторных условиях, при температуре в помещении не выше 25 °С.

9.2. Составить протокол маркировки лунок планшета и ячеек подставки для капилляров в соответствии с кодами образцов и аликвот (по три аликвоты А, В, С для каждого образца).

9.3. Раскапать образцы сыворотки и реактивы в лунки планшета согласно следующей схеме:

Код аликвоты (не путать с кодом лунки нанесенным на планшет)	Объем сыворотки (мкл)	Раствор спинного зонда-	Объем спинного зонда (мкл)
А	50	S1	10
В	50	S2	12
С	50	S3	14

Допускается пипетирование и инкубирование аликвот одновременно нескольких образцов.

Во избежание чрезмерного испарения этанола из лунок планшета, рекомендуется следующее:

- Начинайте пипетирование раствора спинного зонда только после того, как все запланированные к измерению образцы сыворотки раскапаны в лунки.
- Пипетируйте раствор спинного зонда сначала во все лунки, содержащие аликвоты "А", затем аликвоты "В", затем аликвоты "С".
- Раскапывайте одновременно не более 8 образцов, чтобы затем раскапать растворы спинного зонда во все аликвоты не более чем за 3 минуты.
- В любом случае, не пипетируйте более 8 образцов (24 лунки) одновременно.
- Перед шейкированием, сначала плотно закройте заполненные лунки планшета парафилмом, а затем накройте планшет крышкой.

9.4. Поместить планшет в шейкер и инкубировать образцы при температуре 37 °С при частоте встряхивания 5 - 8 Гц в течение 10 минут.

9.5. Подготовка капилляров

Из каждой лунки планшета набрать в отдельный стеклянный капилляр 40 мкл содержимого, используя пипетку с наконечником с резиновой трубкой. Для этого соединить верхнюю часть капилляра с наконечником, вставить нижнюю часть капилляра в лунку планшета и произвести забор содержимого лунки.

Держа капилляр горизонтально, отсоединить наконечник, затем, изменяя угол наклона капилляра, расположить жидкость в капилляре согласно рис. 1 и запечатать капилляр в его верхней части с помощью замазки.

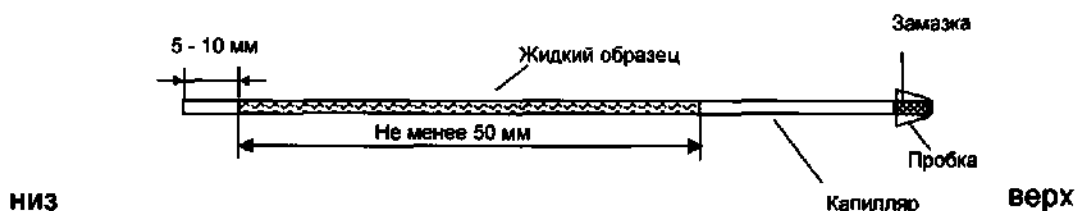


Рис.1. Позиция исследуемого жидкого образца в стеклянном капилляре

При наполнении капилляра удостовериться, что:

- в жидкости отсутствуют пузырьки;
- жидкий образец занимает не менее 50 мм длины капилляра и располагается на расстоянии 5 - 10 мм от нижнего конца капилляра (рис.1). Последнее обеспечивает необходимый резерв длины для небольших перемещений жидкости в закупоренном капилляре, что важно для предотвращения вытекания содержимого при последующих действиях;
- замазка надежно закупоривает капилляр, что предотвращает вытекание содержимого капилляра.

9.6. Поместить капилляр вертикально, запечатанным воском концом вверх, в ячейку подставки для капилляров, в соответствии с кодом образца и кодом аликуты.

Содержимое всех лунок должно быть забрано в капилляры до начала измерений.

Для предотвращения ошибок помещайте капилляры в ячейки подставки строго в соответствии с маркировкой.

9.7. Зафиксировать капилляр в резиновой пробке, как показано на Рис. 1.

9.8. Провести измерения подготовленных капилляров на анализаторе "ESR-Analysator MMS 01-08" (см. Инструкцию по эксплуатации анализатора).

10. Расчет результата анализа

Расчет результата анализа выполняется программой, управляющей работой лабораторного анализатора "ESR-Analysator MMS 01-08", автоматически, по завершению измерений трех капилляров. Результаты анализа автоматически выводятся на экран монитора персонального компьютера, записываются на его диск, и могут быть распечатаны на принтер при выборе оператором соответствующей опции в окне вывода результатов.

11. Контроль качества реагентов и меры, принимаемые при обнаружении изменений

Рекомендуется использовать реагенты в течение 3 дней после первого вскрытия пробирок.

После первого вскрытия растворы следует хранить в холодильнике при температуре не выше 4 °С.

Если срок хранения после первого вскрытия реагентов превышает 2 недели, перед использованием необходимо проверить концентрацию растворов спинового

зонда на анализаторе "ESR-Analysator MMS 01-08" (см. Инструкцию по эксплуатации анализатора). В случае несоответствия измеренных концентраций значениям, указанным в настоящей инструкции, использование реагентов не допускается.