

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ «IgG2-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «IgG2-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации IgG2 в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Среди антител класса IgG человека на основании различий в аминокислотной последовательности тяжелых цепей выделяют четыре подкласса – IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Подкласс IgG2 играет существенную роль в иммунном ответе на полисахаридные антигены инкапсулированных бактерий. Избирательный дефицит IgG2 характеризуется пониженным содержанием IgG2 в сыворотке и сопровождается ослаблением иммунного ответа при инфицировании менингококками, пневмококками, гемофильной палочкой и другими патогенами. В результате повышается риск развития хронических инфекционных заболеваний верхних и нижних дыхательных путей, неэффективными оказываются стандартные схемы лечения и вакцинация полисахаридными антигенами. Снижение содержания IgG2 наблюдают также в большинстве случаев общего переменного иммунодефицита.

1.3. Содержание IgG2 в сыворотке крови человека составляет около 20% от общего уровня IgG. Концентрация IgG2, будучи одним из показателей иммунного статуса индивида, является параметром, который принимают во внимание при диагностике, прогнозе развития ряда заболеваний и контроле эффективности лечения.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgG2 основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к IgG2 человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание IgG2, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к IgG2 с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG2 в исследуемом образце. Концентрацию IgG2 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания IgG2 в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к IgG2 с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
IgA	<0.1
IgM	<0.1
IgE	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG2 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием Набора «IgG2-ИФА» не превышает 8.0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации IgG2 в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей IgG2, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,5–15 г/л и составляет $\pm 10.0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG2 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 1.0 г/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «IgG2-ИФА» концентрация IgG2 в сыворотке крови не превышает 0.06 г/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P272Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	ШТ	-
2	C272Z	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества IgG2 – 0; 0.5; 1; 3; 7.5; 15 г/л, готовы к использованию (по 1 мл каждая)	6	ШТ	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 - прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q272Z	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG2, готова к использованию (1 мл)	1	ШТ	прозрачная бесцветная жидкость
4	T272Z	Конъюгат, готов к использованию (14 мл)	1	ШТ	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5	S011Z3	ИФА-Буфер, готов к использованию (50 мл)	1	ШТ	прозрачная жидкость синего цвета
6	SP272Z	Буфер для разведения образцов, готов к использованию (22 мл)	1	ШТ	прозрачная жидкость желтого цвета
7	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	ШТ.	прозрачная бесцветная жидкость
8	S008Z	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	ШТ.	прозрачная бесцветная жидкость
9	R050Z	Стоп-реагент, готов к использованию (14 мл)	1	ШТ.	прозрачная бесцветная жидкость
10	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	ШТ.	-
11	K272I	Инструкция по применению Набора реагентов «IgG2-ИФА»	1	ШТ	-
12	K272Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «IgG2-ИФА»	1	ШТ	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «IgG2-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации IgG2 в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.8. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов - исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Для предварительной обработки пробы внесите в первый ряд пробирок 10 мкл исследуемого образца и 500 мкл буфера для обработки проб SP272Z ; тщательно перемешайте и инкубируйте в течение 30 минут при температуре 20–25 °С . После окончания инкубации ДОПОЛНИТЕЛЬНО разбавьте все образцы буфером S011Z3 (ИФА-Буфер) в 100 раз , для этого перенесите 10 мкл обработанной пробы во второй ряд пробирок, содержащий 1000 мкл буфера S011Z и снова тщательно перемешайте. Не разбавляйте контрольные образцы и калибровочные пробы!
3	Если предполагаемая концентрация IgG2 в исследуемом образце превышает 15 г/л, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер. Использование образцов других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки крови.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 100 мкл разбавленных исследуемых образцов сыворотки крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.

продолжение таблицы на стр. 8

11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидаина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в яркий желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
13	Постройте в линейных координатах калибровочных график: ось абсцисс (x) – концентрация IgG2 в калибровочных пробах (г/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
14	Определите по калибровочному графику содержание IgG2 в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п.3), умножьте полученный результат на фактор разведения.

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	красный ИФА-Буфер в лунку, мкл	Образец в лунку, мкл	Фактор пересчета
сыворотка крови	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов.	10 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов	10 мкл образц-работан-ной пробы + 1000 мкл ИФА-Буфера	100	1

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций IgG2 в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.06 г/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (15 г/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация IgG2 ниже 0.06 г/л или выше 15 г/л.

Исследуемая группа	Единицы, г/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	1.0	7.5

11. ЛИТЕРАТУРА

1. RG Hamilton - Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. Clin. Chem., Oct 1987; 33: 1707 - 1725.
2. V. A. Semenova, E. Steward-Clark, K. L. Stamey, T. H. Taylor, Jr., D. S. Schmidt, S. K. Martin, N. Marano, and C. P. Quinn - Mass Value Assignment of Total and Subclass Immunoglobulin G in a Human Standard Anthrax Reference Serum. Clin. Diagn. Lab. Immunol., Sep 2004; 11: 919 - 923.