

# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG4 В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «IgG4-ИФА»

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

**1.1.** Набор реагентов «IgG4-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации IgG4 в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Содержание IgG4 в сыворотке крови составляет около 3% от общего уровня IgG.

**1.3.** Антитела подкласса IgG4 вырабатываются при длительном контакте с антигеном, что характерно для хронических грибковых инфекций, паразитарных инвазий, аутоиммунных заболеваний.

**1.4.** Особую роль IgG4 подкласс играет при аллергии. Повышенный уровень IgG4 антител выявлен в сыворотках пчеловодов, подвергавшихся укусам пчел. Предполагается, что выработка IgG4-антител при лечении модифицированными аллергенами (аллергоидами) может считаться благоприятным прогностическим признаком. Вместе с тем, уровень IgG4 в сыворотке часто встречается у больных различными аллергическими заболеваниями (бронхиальная астма, atopический дерматит), в том числе и у пациентов с нормальным уровнем общего IgE.

**1.5.** Дефицит IgG4 подкласса часто сопряжен с IgG2-дефицитом и сопровождается ослаблением иммунного ответа.

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение IgG4 основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к IgG4 человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание IgG4, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к IgG4 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 IgG4 в исследуемом образце. Концентрацию IgG4 в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания IgG4 в калибровочных пробах.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1. Специфичность.** Перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к IgG4 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 IgG4 в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «IgG4-ИФА» не превышает 8.0%.

#### 3.3. Линейность.

Зависимость концентрации IgG4 в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей IgG4, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.075–2.5 г/л и составляет  $\pm 10.0\%$ .

#### 3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG4 предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0.25 г/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

#### 3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «IgG4-ИФА» концентрация IgG4 в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.02 г/л.

## 4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P274Z	SORB MTP	<b>Планшет</b> 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C274Z	CAL 1-5	<b>Калибровочные пробы</b> на основе трис-буфера (pH 7,2-7,4), содержащие известные количества IgG4 – <b>0</b> ; <b>0.075</b> ; <b>0.25</b> ; <b>0.75</b> ; <b>2.5 г/л</b> , готовы к использованию (по 1 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q274Z	CONTROL	<b>Контрольная сыворотка</b> на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG4, готова к использованию (1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T274Z	CONJ HRP	<b>Конъюгат</b> , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5 S011Z4	DIL SPE	<b>ИФА-Буфер</b> , готов к использованию (100 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	<b>Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)</b> , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 26X	<b>Концентрат отмывочного раствора</b> (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26x-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	<b>Стоп-реагент</b> , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K274I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «IgG4-ИФА»	1	шт.	-
11 K274Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «IgG4-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 5–250 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 (плазмы) 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 «IgG4-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 42 исследуемых образцов, 5 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 (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

**8.5.** Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) 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 IgG4 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 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	<b>Разбавьте образцы</b> сыворотки (плазмы) крови в 5000 раз, используя ИФА-Буфер. Пример: в пробирку Разведение 1 (1:100): 10 мкл образца + 990 мкл ИФА-Буфера. В другую пробирку Разведение 2 (1:5000) добавьте 10 мкл Разведения 1 + 490 мкл ИФА-Буфера. Разведение 2 (1:5000) следует использовать в анализе. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку.
3	Если предполагаемая концентрация общего IgG4 в исследуемом образце превышает 2.5 г/л, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может искажать результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца биологических жидкостей.
4	<b>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 (плазмы) крови.</b> 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. <b>Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.</b>
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и <b>отмойте лунки 3 раза.</b> 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	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.</b>
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и <b>инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.</b>
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и <b>отмойте лунки 5 раз.</b>
10	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина.</b> Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. <b>Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10-20 минут</b> в зависимости от степени развития синего окрашивания.

продолжение таблицы на стр. 8

11	<b>Внесите во все лунки</b> с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидаина, <b>по 100 мкл стоп-реакента</b> , при этом содержащее лунок окрашивается в яркий-желтый цвет.
12	<b>Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержащего лунок планшета на фотометре</b> вертикального сканирования <b>при длине волны 450 нм</b> . Измерение ОП содержащего лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реакента. Бланк фотометра выставьте по калибровочной пробе С1.

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	ИФА-Буфер, мкл	Образец в лунку, мкл	Фактор пересчета
сыворотка (плазма) крови	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов.	Разведение 1 (1:100): 10 мкл образца + 990 мкл ИФА-Буфера. В другую пробирку Разведение 2 (1:5000) добавьте 10 мкл Разведение 1 + 490 мкл ИФА-Буфера. Разведение 2 (1:5000) следует использовать в анализе	0	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 IgG4 в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.02 г/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (2.5 г/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация IgG4 ниже 0.02 г/л или выше 2.5 г/л.

Исследуемая группа	Единицы, г/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	0.1	1.2

## 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.