

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО IgG В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ «общий IgG-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «общий IgG-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации общего IgG в биологических жидкостях (см. таблицу М) методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Антитела класса IgG преобладают в составе фракции γ – глобулинов и являются основным классом антител, присутствующих в сыворотке крови человека. Увеличение концентрации IgG в сыворотке крови является основным признаком зрелого иммунного ответа, а снижение их концентрации ниже 5 г/л свидетельствует о развитии тяжелого иммунодефицита. Определение концентрации IgG в сыворотке крови, как и соотношения содержания IgG/IgA/IgM может служить одним из основных критериев оценки иммунного статуса индивида и использоваться при контроле лечения некоторых инфекционных заболеваний. Резкое повышение концентрации IgG в сыворотке крови наблюдается при миеломной болезни.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к общему IgG 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 общего IgG в одном и том же образце биологических жидкостей с использованием Набора «общий IgG-ИФА» не превышает 8.0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации общего IgG в образцах биологических жидкостей при разведении их биологическими жидкостями, не содержащими общий IgG, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1–25 г/л и составляет $\pm 10.0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации общего IgG предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5.0 г/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «общий IgG-ИФА» концентрация общего IgG в биологических жидкостях не превышает 0.06 г/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P271Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C271Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (pH 7.2-7.4), содержащие известные количества общего IgG – 0; 1; 5; 10; 25 г/л , готовы к использованию (по 1 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q271Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием общего IgG, готова к использованию (1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T271Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5 SP271Z	DIL SPE	Буфер для разведения образцов , готов к использованию (100 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (TMB), готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26x-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K271I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «общий IgG-ИФА»	1	шт.	-
11 K271Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «общий IgG-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (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, противозидемического 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 10–250 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 ($+18\dots+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 $+2\dots+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 «общий IgG-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;
- Буфер для разведения образцов, 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 общего IgG 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	Разбавьте образцы сыворотки (плазмы) крови в 5000 раз , используя Буфер для разведения образцов (SP271Z). Пример: в пробирку Разведение 1 (1:100) добавьте 10 мкл образца + 990 мкл Буфера для разведения образцов. В другую пробирку Разведение 2 (1:5000) добавьте: 10 мкл Разведения 1 + 490 мкл Буфера для разведения образцов. Разведение 2 (1:5000) следует использовать в анализе. Способ разведения для других видов материала приведен в таблице М. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку.
3	Если предполагаемая концентрация общего IgG в исследуемом образце превышает 25 г/л, его следует дополнительно развести, используя Буфер для разведения образцов (SP271Z). Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца биологических жидкостей.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки . При исследовании сыворотки (плазмы) крови в лунки, предназначенные для исследуемых образцов, внесите по 100 мкл разбавленных образцов (Разведение 2) . При исследовании других видов материала объем вносимого исследуемого образца указан в таблице М. 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 лунки 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 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.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-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 представляйте по калибровочной пробе С1.

продолжение таблицы на стр. 8

13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (X) – концентрация общего IgG 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 общего IgG в исследуемых образцах. Если исследуемый образец преобразовали (см. п. 3), умножьте полученный результат на фактор разведения. При анализе различных видов материала необходимо умножить полученные значения на Фактор пересчета, приведенный в таблице М.

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	Буфер для разведения образцов в лунку, 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 Буфера для разведения образцов. Вторую пробу Разведение 2 (1:5000) добавьте 10 мкл Разведения 1 + 490 мкл Буфера для разведения образцов. Разведение 2 (1:5000) следует использовать в анализе	0	100	1
слюна	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.		90	10	0.002
моча	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.		50	50	0.0004
спинно-мозговая жидкость	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.	10 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов	0	100	0.01

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 общего IgG в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.06 г/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (25 г/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация общего IgG ниже 0.06 г/л или выше 25 г/л.

Исследуемая группа	Единицы, г/л	
	Нижний предел	Верхний предел
новорожденные	7.0	15
1-3 месяца	2.7	8.0
4-6 месяцев	1.8	8.5
7-12 месяцев	3.5	12
1-6 лет	6.5	18
7-11 лет	8.5	15
> 11 лет	9.0	20

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.