

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Иммуноглобулин М (IgM) присутствует в крови как в мономерной, так и в пентамерной формах. Повышенная концентрация IgM в сыворотке крови является основным признаком первичного иммунного ответа, а также может свидетельствовать о персистирующих бактериальных и вирусных инфекциях. Снижение концентрации IgM в сыворотке крови наблюдается при некоторых иммунодефицитах. Резкое повышение уровня IgM характерно для макроглобулинемии (болезни Вальденстрема) и IgM миеломы.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

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

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания общего IgM в одном и том же образце биологических жидкостей с использованием Набора «Общий IgM-ИФА» не превышает 8.0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации общего IgM в образцах биологических жидкостей при разведении их биологическими жидкостями, не содержащей общий IgM, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.5–10 г/л и составляет $\pm 10.0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации общего IgM предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 2.0 г/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

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

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P277Z	SORV MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C277Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества общего IgM – 0; 0.5; 2; 5; 10 г/л , готовы к использованию (по 1 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости пурпурного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q277Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием общего IgM, готова к использованию (1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T277Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5 SP277Z	DIL SPE	Буфер для разведения образцов , готов к использованию (100 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), 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 K2771	-	Инструкция по применению Набора реагентов «Общий IgM-ИФА»	1	шт.	-
11 K277Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Общий IgM-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, 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 ($+18\dots+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 IgM-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 IgM 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 повторях и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Разбавьте образцы 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. Способ разведения для других видов материала приведен в таблице М. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку.
3	Если предполагаемая концентрация общего IgM в исследуемом образце превышает 10 г/л, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер. 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, заклейте 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.
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 выставляйте по калибровочной пробе С1.

продолжение таблицы на стр. 8

13	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация общего IgM 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 IgM в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (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. В другую пробирку Разведение 2 (1:5000) добавьте 10 мкл Разведение 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.		80	20	0.001

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 IgM в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.06 г/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (10 г/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация общего IgM ниже 0.06 г/л или выше 10 г/л.

Исследуемая группа	Единицы, г/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	0.7	3.7
новорожденные	0.1	0.35
1-3 месяца	0.12	0.9
4-6 месяцев	0.25	1.2
7-12 месяцев	0.35	1.0
1-6 лет	0.55	2.2
7-11 лет	0.65	1.7

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Erik J. Wiersma, Cathy Collins, Shafie Fazel, and Marc J. Shulman Structural and Functional Analysis of J Chain-Deficient IgM J. Immunol., Jun 1998; 160: 5979 – 5989.