

УТВЕРЖДЕНА

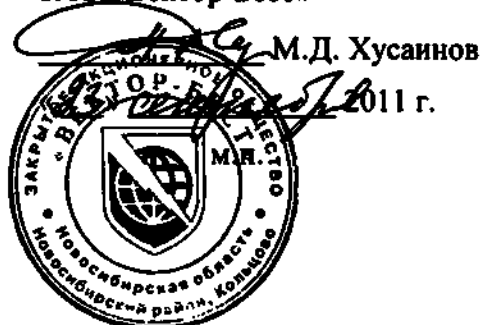
Приказом Росздравнадзора

от _____ 2011 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации пепсиногена 2 в сыворотке крови
(Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ» предназначен для количественного определения концентрации пепсиногена 2 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Пепсиноген 2 представляет собой белок – предшественник пепсина, синтезируется главными и шеечными клетками слизистой оболочки желудка, а так же пилорическими железами антральной части желудка и Бруннеровыми железами проксимальной части двенадцатиперстной кишки. В норме сывороточный уровень пепсиногена 2 составляет $4 \div 22$ мкг/л. Соотношение концентраций пепсиногена 1 (PG1) и пепсиногена 2 (PG2) в сыворотке или плазме здоровых людей больше 3:1.

1.3. Пепсиноген 2 является маркером воспаления слизистой оболочки желудка любой этиологии, при этом его уровень становится выше нормы.

Соотношение пепсиноген 1/пепсиноген 2 (PG1/PG2) линейно уменьшается с увеличением выраженности атрофического гастрита в области тела желудка. Это соотношение составляет менее 2,5 при выраженном атрофическом гастрите (тяжелом или умеренном) тела желудка. Показано, что риск развития рака желудка повышается при низком соотношении PG1/PG2. Тест предназначен для использования в качестве дополнительного диагностического критерия при диагностике атрофического гастрита с поражением тела желудка, кото-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной и н.с. А.С. Сальниковым.

A handwritten signature in the bottom right corner of the page.

рый является фактором риска по развитию рака желудка. Определение пепсиногена 2 используется вместе с определением пепсиногена 1 для расчета их соотношения PG1/PG2.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 43 неизвестных образцов, 4 калибровочных образцов и 1 контрольного образца (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном твердофазном иммуноферментном анализе («сэндвич-вариант») с применением двух типов моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к пепсиногену 2.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител с пероксидазой, во время инкубации происходит одновременное связывание пепсиногена 2 с моноклональными антителами, иммобилизованными на лунках планшета, и конъюгатом. Невсвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента. Степень окрашивания пропорциональна концентрации пепсиногена 2 в анализируемых образцах.

Концентрацию пепсиногена 2 в анализируемых образцах сывороток определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания пепсиногена 2 в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к пепсиногену 2, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества пепсиногена 2 – 0; 5; 10; 50 мкг/л; концентрации пепсиногена 2 в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 4 пробирки (по 0,2 мл);
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием пепсиногена 2, готовый для использования – 1 пробирка (0,2 мл);
- конъюгат моноклональных антител к пепсиногену 2 с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (25,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);

– раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13,0 мл);

– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл);

Набор дополнительно комплектуется:

– пленками для заклеивания планшета – 1 шт.;

– ванночками для реагентов – 2 шт.;

– наконечниками для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.;

– трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител с пепсиногеном 1.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания пепсиногена 2 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентрации пепсиногена 2 при разведении анализируемых проб сывороткой крови, не содержащей пепсиноген 2, не превышает 10% в диапазоне концентраций 10-100 мкг/л.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации пепсиногена 2 предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 10 мкг/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация пепсиногена 2 не превышает 0,5 мкг/л.

3.6. Клиническая проверка. Концентрации пепсиногена 1 и пепсиногена 2 измеряли у 148 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–55 лет. Значение сывороточной концентрации пепсиногена 2 находилось в пределах от 4 до 22 мкг/л. Соотношение концентраций пепсиногена 1 и пепсиногена 2 (PG1/PG2) больше 3,0.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации пепсиногена 2 соответствующие нормальным для данного региона у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае

попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. 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.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьёзному искажению результатов ИФА.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °C и 400-800 об/мин;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 50, 100 и 350 мкл;

- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 сут или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 18-25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре 18-25 °С в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа пробирки с калибровочными образцами и контрольным образцом встряхнуть.

7.4. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30-40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 сут.

7.5. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

В таблице 1 приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	4,0	2,0
3	6,0	до 150	6,0	3,0
4	8,0	до 200	8,0	4,0
5	10,0	до 250	10,0	5,0
6	12,0	до 300	12,0	6,0
7	14,0	до 350	14,0	7,0
8	16,0	до 400	16,0	8,0
9	18,0	до 450	18,0	9,0
10	20,0	до 500	20,0	10,0
11	22,0	до 550	22,0	11,0
12	24,0	до 600	24,0	12,0

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина

Раствор тетраметилбензидина готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

В таблице 1 приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл каждого калибровочного образца и по 10 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дубликатах по 10 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

7.8. Внести во все лунки по 200 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.4). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания.

Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании каждой промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.12. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ плюс, по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации пепсиногена 2 в калибровочных образцах (мкг/л).

9.2. Определить содержание пепсиногена 2 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре 2-8 °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов «Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности;

- раствор ТМБ плюс, конъюгат после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, контрольный образец после вскрытия пробирок можно хранить в плотно закрытых пробирках при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- промывочный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 суток.

10.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации пепсиногена 2 в контрольном образце.

10.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2–8°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.7. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 363-20-60, тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.

E-mail: ybobtk@vector-best.ru

Зав. лабораторией НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

сер
Н.Н. Сорокина

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

А
М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»
зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России



сер
д.м.н., профессор В.В. Долгов
«30» сентября 2011 г.

Подпись <i>В.В. Долгов</i>
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись <i>А</i>
“ ” 20__ года



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
девят листов

Handwritten signature