

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов
_____ 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного
количественного определения общих IgG, IgM, IgA
в сыворотке крови
(Иммуноскрин-Г, М, А-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Иммуноскрин-Г, М, А-ИФА-БЕСТ предназначен для одновременного определения концентраций общих иммуноглобулинов классов G, M, A (IgG, IgM, IgA) в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Одновременное определение концентраций общих IgG, IgM, IgA может быть использовано в клинических, диагностических и научно-исследовательских лабораториях.

1.3. Набор рассчитан на проведение в дублях одновременного анализа 10 исследуемых, 5 калибровочных образцов и 1 контрольной сыворотки.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. В состав набора входят три типа стрипов, которые различаются специфичностью иммобилизованных на них антител к тяжелым цепям соответственно IgG, IgM или IgA. Используемый твердофазный метод иммуноанализа основан на принципе «сэндвича». Анализ проводят в две стадии. На первой стадии калибровочные образцы с известными концентрациями IgG, IgM, IgA и исследуемые образцы инкубируют в лунках всех трех типов стрипов. Затем планшет отмывают. На второй стадии связавшиеся в лунках иммуноглобулины IgG, IgM, IgA обрабатывают конъюгатом МКАТ к легким цепям иммуноглобулинов (каппа- и лямбда-цепи) с пероксидазой хрена. После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором НИИ СД М.П. Гришаевым, старшим научным сотрудником НИИ СД Т.И. Колочевой.

«иммобилизованные МКАТ – соответствующий иммуноглобулин – конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–650 нм.

Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрациям IgG, IgM, IgA в анализируемом образце.

Концентрации IgG, IgM, IgA в пробах определяют по соответствующим калибровочным графикам.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный с иммобилизованными антителами к:
 - IgG – 4 стрипа (черная маркировка);
 - IgM – 4 стрипа (красная маркировка);
 - IgA – 4 стрипа (зеленая маркировка);
- калибровочные образцы (КО) на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно препаратов человеческих IgG (ICN, США, кат. № 55908), IgM (ICN, США, кат. № 55837), IgA (ICN, США, кат. № 55906), содержащие известные количества IgG, IgM, IgA.

КО I: 0 МЕ/мл IgG; 0 МЕ/мл IgM; 0 МЕ/мл IgA;

КО II: 32 МЕ/мл IgG; 34 МЕ/мл IgM; 35 МЕ/мл IgA;

КО III: 68 МЕ/мл IgG; 73 МЕ/мл IgM; 75 МЕ/мл IgA;

КО IV: 136 МЕ/мл IgG; 146 МЕ/мл IgM; 150 МЕ/мл IgA;

КО V: 272 МЕ/мл IgG; 292 МЕ/мл IgM; 300 МЕ/мл IgA.

Концентрации IgG, IgM, IgA могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 5 фл. (по 0,4 мл);

- контрольная сыворотка (КС) с известными концентрациями IgG, IgM, IgA – 1 флакон (0,4 мл);
- конъюгат МКАТ к легким цепям иммуноглобулинов с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,4 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ-Т) – 1 флакон, (28,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 2 флакона (по 12,0 мл);

- раствор для разведения конъюгата (РРК) – 1 флакон (13,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- плёнкой для заклеивания планшета – 2 шт;
- ванночкой для реагента – 2 шт;
- наконечниками для пипетки на 4 – 200 мкл – 16 шт.
- трафаретом для построения калибровочного графика – 3 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – планшет разборный (12 восьмиугольных стрипов) – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. В наборе реагентов «Иммуоскрин-Г, М, А-ИФА-БЕСТ» используются моноклональные антитела, обладающие высокой специфичностью соответственно к общим IgG, IgM, IgA. Перекрестного связывания с нецелевыми иммуноглобулинами или альбумином в физиологических концентрациях не наблюдалось.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания общих IgG, IgM, IgA в одном и том же образце с использованием набора «Иммуоскрин-Г, М, А-ИФА-БЕСТ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентраций общих IgG, IgM, IgA в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей IgG, IgM, IgA, не превышает 10% в диапазоне концентраций: 32-272 МЕ/мл IgG; 34-292 МЕ/мл IgM; 35-300 IgA.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации общих IgG, IgM, IgA предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца КО III. Процент «открытия» составляет 90-110 %.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация общего IgG не превышает 2,5 МЕ/мл. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация общего IgM не превышает 4,0 МЕ/мл. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация общего IgA не превышает 1,5 МЕ/мл.

3.6. Клиническая проверка.

Концентрацию общего IgG измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 107 здоровых мужчин и женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет: концентрация общего IgG составила 60-200 МЕ/мл; у 103 детей юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 1-15 лет концентрация общего IgG составила 37-194 МЕ/мл.

Концентрацию общего IgM измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 107 здоровых мужчин и женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет: концентрация общего IgM составила 60-250 МЕ/мл; у 103 детей юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 1-15 лет концентрация общего IgM составила 60-275 МЕ/мл.

Концентрацию общего IgA измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 107 здоровых мужчин и женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет: концентрация общего IgA составила 57-285 МЕ/мл; у 103 детей юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 1-15 лет концентрация общего IgA составила 20-200 МЕ/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации общих IgG, IgM, IgA, соответствующие нормальным 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 в состав набора входят компоненты крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных 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 по-

мещениях, предназначенных для работы с наборами.

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 - 650 нм;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

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°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 6 мес.

Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 2000-3000 об/мин в течение 10 мин при температуре 18-25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

7.2. Приготовление рабочего промывочного раствора

В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл внести 28 мл 25-кратного фосфатно-солевого буферного раствора с твином, довести объем до 700 мл дистиллированной водой, тщательно перемешать до полного растворения. При выпадении осадка солей в

концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

Промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.3. Приготовление калибровочных образцов и контрольной сыворотки

Калибровочные образцы и контрольная сыворотка готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений.

Перед проведением анализа флаконы с калибровочными образцами и контрольной сывороткой встряхнуть, чтобы капли растворов со стенок и крышки опустились на дно. Затем содержимое пробирок тщательно перемешать пипетированием, избегая вспенивания.

7.4. Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток

В лунки планшета для предварительного разведения внести 310 мкл РРС.

Затем в одну из лунок, например А1, добавить 10 мкл анализируемой сыворотки и тщательно перемешать наконечником пипетки, избегая образования пены. После этого из лунки отобрать 10 мкл и внести в соседнюю лунку, например А2, и также тщательно перемешать. В лунке А2 – рабочее разведение сыворотки в 1000 раз. Аналогично развести другие анализируемые образцы сывороток (например, в лунках В1 и В2, С1 и С2 и т.д.):

Использовать в течение 30 мин после приготовления.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Внести во флакон 10,8 мл раствора для разведения конъюгата и добавить 1,2 мл концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре не более 3 ч.

7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Внести во флакон 12,0 мл СБР и добавить 0,6 мл концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре 18-25 °С не более 3 ч.

7.7. Во все лунки стрипов внести по 100 мкл РРС.

7.8. В верхние лунки А1, А2, А5, А6, А9, А10 внести по 20 мкл калибровочного образца КО I. Далее вносят в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных образцов (КО II, КО III, КО IV, КО V) и контрольной сыворотки (КС) согласно схеме постановки анализа (см. схему). В остальные лунки вносят по 20 мкл разведенных анализируемых образцов сывороток крови, каждый раз меняя наконечник.

При каждом внесении образцов в лунки тщательно перемешивать пипетированием, избегая вспенивания.

Внесение образцов необходимо проводить быстро, в течение 15–20 минут.

Схема внесения образцов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КО I	КО I	АО 3	АО 3	КО I	КО I	АО 3	АО 3	КО I	КО I	АО 3	АО 3
B	КО II	КО II	АО 4	АО 4	КО II	КО II	АО 4	АО 4	КО II	КО II	АО 4	АО 4
C	КО III	КО III	АО 5	АО 5	КО III	КО III	АО 5	АО 5	КО III	КО III	АО 5	АО 5
D	КО IV	КО IV	АО 6	АО 6	КО IV	КО IV	АО 6	АО 6	КО IV	КО IV	АО 6	АО 6
E	КО V	КО V	АО 7	АО 7	КО V	КО V	АО 7	АО 7	КО V	КО V	АО 7	АО 7
F	КС	КС	АО 8	АО 8	КС	КС	АО 8	АО 8	КС	КС	АО 8	АО 8
G	АО 1	АО 1	АО 9	АО 9	АО 1	АО 1	АО 9	АО 9	АО 1	АО 1	АО 9	АО 9
H	АО 2	АО 2	АО 10	АО 10	АО 2	АО 2	АО 10	АО 10	АО 2	АО 2	АО 10	АО 10
	IgG (черный цвет)				IgM (красный цвет)				IgA (зеленый цвет)			

КО I, КО II, КО III, КО IV, КО V – калибровочные образцы;

КС – контрольная сыворотка;

АО – анализируемый образец.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °C.

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки стрипов 5 раз рабочим промывочным раствором (п. 7.2) и тщательно удалить влагу.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (350 мкл рабочего промывочного раствора). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.5). Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °C.

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

7.12. По окончании второй инкубации содержимое лунок удалить и промыть лунки, как указано в п. 7.10.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см. п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 10-15 мин при температуре 18-25 °C.

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

7.14. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензида, по 100 мкл стоп-реагента.

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 - 650 нм; или 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 калибровочные графики зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентраций соответствующих иммуноглобулинов (IgG, IgM, IgA) в калибровочных образцах (МЕ/мл).

9.2. Определить содержание соответствующих иммуноглобулинов в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

В случае дополнительного разведения анализируемых образцов необходимо полученную концентрацию соответствующих иммуноглобулинов умножить на фактор разведения.

9.3. Для представления результатов измерений концентрации общих IgG, IgM, IgA в мг/мл, применять соответствующие коэффициенты пересчета:

для IgG 12,5 (1 мг/мл IgG = 12,5 МЕ/мл IgG);

для IgM 125 (1 мг/мл IgM = 125 МЕ/мл IgM);

для IgA 71,4 (1 мг/мл IgA = 71,4 МЕ/мл IgA).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов Иммуоскрин-G, М, А-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.

10.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2–8 °С не более 48 ч или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

10.3. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

По вопросам, касающимся качества набора Иммуноскрин-G, М, А-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, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (499) 120-60-95; 120-60-96.

Старший научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Зав. кафедры КЛД РМАПО
д.м.н., профессор

Т.И. Колочева

М.П. Гришаев

